

Université de Montréal

Les interactions foeto-maternelles et l'implantation embryonnaire chez le vison

par

Joëlle Desmarais

Département de biomédecine vétérinaire
Centre de recherche en reproduction animale
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Avril, 2007

© Joëlle Desmarais, 2007



SF
607
U54
2007
v.015

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les interactions foeto-maternelles et l'implantation embryonnaire chez le vison

présentée par :
Joëlle Desmarais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alan K. Goff, président-rapporteur
Bruce D. Murphy, directeur de recherche
Lawrence C. Smith, membre du jury
Daniel Dufort, examinateur externe
Mario Jacques, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'implantation est précédée d'une période d'arrêt du développement embryonnaire, aussi appelée diapause, chez certains mammifères dont le vison (*Mustela vison*). Chez les membres de cette espèce, la diapause se termine lors du prolongement de la photopériode durant l'équinoxe hivernal dans l'hémisphère Nord sous l'influence de la sécrétion de prolactine. L'objectif principal de cette étude est de caractériser les changements qui surviennent dans l'embryon suite à sa sortie de la diapause, et d'identifier des gènes impliqués dans les interactions foeto-maternelles lors de l'implantation et de la formation du placenta chez le vison.

Le premier objectif est de caractériser le développement de l'embryon suite à sa sortie de la diapause. Nous déterminons que l'augmentation de taille du blastocyste est le premier changement embryonnaire qui survient lors de la reprise du développement suivant la sortie de la diapause, et que le facteur de croissance fibroblastique-4 (FGF4) semble être impliqué dans la prolifération du trophoblaste.

Nous déterminons ensuite que la progranuline est fortement exprimée dans le cytotrophoblaste lors de la formation des villosités du placenta, dans les cellules épithéliales en prolifération et dans les cellules endothéliales fœtales et maternelles, ce qui suggère un rôle pour cette glycoprotéine dans la prolifération de différents types cellulaires du placenta.

En troisième lieu, nous suggérons que le *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) est exprimé spécifiquement dans les cellules du syncytiotrophoblaste et

aux cellules du cytotrophoblaste en cours de différenciation. Nous démontrons ensuite que stimulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ induit un changement de morphologie et de cycle cellulaire au niveau des cellules trophoblastiques in vitro, ainsi qu'une augmentation de l'expression de PPAR γ , de l'ostéopontine et de l'adipophiline, lesquels sont des gènes marqueurs de cellules invasives du placenta.

En résumé, en utilisant un modèle animal d'implantation différée, nous démontrons que la reprise du développement embryonnaire est associée à plusieurs changements cellulaires, et que FGF4 est probablement impliqué dans ces processus. La progranuline et PPAR γ semblent jouer un rôle important durant l'implantation et la formation du placenta. Nous identifions donc de nouveaux gènes impliqués dans les interactions foeto-maternelles lors de l'implantation et de la formation du placenta chez le vison.

Mots-clés : Implantation, placenta, embryon, trophoblaste, diapause, récepteur nucléaire, facteur de croissance, facteur d'adhésion, vison.

ABSTRACT

In the mink as well as in other mammalian species, implantation is preceded by an obligate arrest in embryo development. This developmental arrest, also known as embryonic diapause, is terminated by the lengthening of the photoperiod, corresponding with the vernal equinox in the Northern hemisphere in the mink. The main objective of this study was to profile the changes that take place in the embryo after its escape from diapause, and to identify genes involved in feto-maternal interaction during implantation and early placenta formation in the mink.

The first objective was to characterize the changes that take place in the embryo after the termination of diapause. We determined that an increasing blastocyst diameter is the first change that occurs following the escape from diapause, and that the fibroblast growth factor-4 (FGF4) seems to be involved in trophoblast proliferation.

We next defined that progranulin is strongly expressed in the cytotrophoblast during early villus formation, in proliferating uterine epithelial cells as well as in fetal and maternal endothelial cells, thus suggesting a role for this glycoprotein in the proliferation of different cell types of the placenta.

Thirdly and finally, we suggested that the nuclear receptor Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) is expressed specifically to the syncytiotrophoblast cells and to the cytotrophoblast cells undergoing differentiation. We also demonstrated that the stimulation of PPAR γ transcriptional activity induces a morphological change as well as an

attenuation of cellular proliferation in the trophoblast cells in vitro, and also induce an upregulation of PPAR γ , osteopontin and adipophilin expression.

In summary, by using an experimental animal model displaying delayed implantation, we show that many modifications occur at the cellular level in the embryo at the onset of implantation, and FGF4 is likely involved in these processes. Progranulin PPAR γ seems to be implicated in embryo implantation and placental formation. Thus, we identify novel roles for known genes involved in feto-maternal interactions during implantation and early placenta formation in the mink.

Keywords : Implantation, placenta, embryo, trophoblast, diapause, nuclear receptor, growth factor, adhesion factor, mink.

TABLE DES MATIÈRES

1.0 INTRODUCTION	1
2.0 RECENSION DE LA LITTÉRATURE	8
2.1 Le vison : Un modèle d'implantation différée.....	8
2.1.1 L'implantation différée.....	8
2.1.2 Le développement embryonnaire.....	8
2.1.3 Les variations sur le thème de la diapause.....	10
2.2 Le contrôle endocrinien de la sortie de diapause obligatoire et de l'implantation	11
2.2.1 Le contrôle maternel.....	11
2.2.2 Les stimulus environnementaux.....	11
2.2.3 L'axe gonado-hypophysaire	13
2.2.4 Les facteurs ovariens	14
2.3 L'implantation et la formation du placenta	16
2.3.1 La réaction d'implantation.....	16
2.3.2 La fenêtre de réceptivité	17
2.3.3 Généralités sur le placenta	18
2.3.4 Classification du placenta du vison au niveau macroscopique.....	18
2.3.5 Classification du placenta au niveau microscopique.....	20
2.3.6 L'implantation par déplacement épithélial	20
2.3.7 La placentogénèse	21
2.3.8 Les zones du placenta.....	23
2.4 Les interactions foeto-maternelles impliquées dans le contrôle de l'implantation...24	
2.4.1 L'oestrogène	24
2.4.2 Le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF).....	25
2.4.3 Les facteurs de croissance épidermaux (EGF).....	26
2.4.4 Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF).....	27
2.4.5 La progranuline	29
2.4.6 Les prostaglandines	31

2.4.7 Les récepteurs activés par les proliférateurs de péroxisomes (PPAR).....	34
2.4.8 Les facteurs d'adhésion cellulaire.....	42
3.0 ARTICLE PREMIER	55
3.1 ABSTRACT	57
3.2 INTRODUCTION	58
3.3 MATERIALS AND METHODS	59
3.3.1 Animals and Treatments.....	59
3.3.2 DNA and Protein Synthesis.....	60
3.3.3 Culture of Trophoblast and ICM-derived Cells.....	61
3.3.4 RNA Isolation.....	62
3.3.5 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	63
3.3.6 Data Analyses	64
3.4 RESULTS.....	65
3.4.1 Evolution of Embryo Size During Reactivation.....	65
3.4.2 Embryo DNA and Protein Synthesis.....	65
3.4.3 The Growth Potential of ICM and Trophoblast.....	66
3.4.4 Provenance of FGF4 and Its Effects on Mink Trophoblast Cell Cultures	67
3.5 DISCUSSION.....	68
3.5.1 Embryo Expansion in the Reactivated Blastocyst	69
3.5.2 DNA Synthesis and Cell Proliferation Following Activation	71
3.5.3 FGF4 and FGFR2 Expression in Mink Embryos and Embryo-Derived Tissues	72
3.5.4 ICM and Trophoblast Cell Lines Derived From the Mink Embryo	72
3.6 ACKNOWLEDGMENTS.....	74
3.7 REFERENCES	75
3.8 FIGURES AND TABLES	80
4.0 ARTICLE DEUXIÈME.....	97
4.1 ABSTRACT	98
4.1 ABSTRACT	98

4.2 INTRODUCTION	100
4.3 MATERIALS AND METHODS	103
4.3.1 Animals	103
4.3.2 Cloning of mink partial cDNA sequence	104
4.3.3 In situ hybridization	105
4.3.4 Immunohistochemistry	106
4.4 RESULTS.....	107
4.4.1 Cloning and sequence analysis of mink progranulin partial cDNA	107
4.4.2 Progranulin mRNA is expressed in mink endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation	107
4.4.3 Progranulin protein is expressed in mink endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation	108
4.5 DISCUSSION.....	110
4.5.1 Mink progranulin partial cDNA sequence	110
4.5.2 Progranulin and endometrial gland proliferation.....	111
4.5.3 Progranulin and cytotrophoblast proliferation.....	112
4.5.4 Progranulin and maternal endothelial cell proliferation.....	112
4.5.5 The regulation and the role of progranulin during implantation in the mink	113
4.6 ACKNOWLEDGEMENTS	115
4.7 REFERENCES	116
5.0 ARTICLE TROISIÈME.....	134
5.2 INTRODUCTION	137
5.3 MATERIALS AND METHODS	139
5.3.1 Animals and Sampling	139
5.3.2 RNA probes and in situ hybridization.....	140
5.3.3 Immunohistochemistry	141
5.3.4 Trophoblast cell culture and treatments	142
5.3.5 Proliferation assay.....	144

5.3.6 Reporter gene assay.....	144
5.3.7 Flow cytometry	145
5.3.8 RNA isolation and Real-time Polymerase Chain Reaction.....	145
5.3.9 Statistical Analyses	146
5.4 RESULTS.....	147
5.4.1 PPARG and RXRA expression are upregulated at the time of implantation	147
5.4.2 The prostanoid, 15-d-PGJ ₂ , an endogenous ligand for PPARG, modulates cell cycle progression of the trophoblast cells in vitro	148
5.4.3 Treatment with 15-d-PGJ ₂ induces a PPARG-positive and a potentially invasive trophoblast cell phenotype in vitro	151
5.5 DISCUSSION.....	153
5.6 ACKNOWLEDGMENTS.....	158
5.7 REFERENCES	158
5.8 TABLES AND FIGURES	166
5.8 TABLES AND FIGURES	166
6.0 DISCUSSION GÉNÉRALE	183
6.1 La chronologie des changements intervenants dans l'embryon en préparation à l'implantation	184
6.2 L'établissement de lignées embryonnaires in vitro chez le vison	187
6.3 Le rôle de la progranuline dans l'implantation chez le vison	189
6.4 Le rôle de PPAR γ dans l'implantation.....	191
6.5 L'activation de la différenciation des cellules trophoblastiques par la prostaglandine 15-d-PGJ ₂ , via son récepteur PPAR γ	192
6.6 La différenciation du trophoblaste chez le vison, étude d'une espèce comparative.....	195
6.7 Directions futures.....	196
7.0 CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	198
7.1 La sortie de la diapause embryonnaire.....	198
7.2 L'expression et le rôle probable de la progranuline en période périimplantatoire ...	198

7.3 L'implantation et la différenciation du trophoblaste sont des événements influencés par l'activité de PPAR γ	200
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Capacity for growth of inner cell mass (ICM) and trophoblast cells from mink embryos.....	80
Tableau 5.1	Primers used for real-time PCR.....	166
Tableau 7.1	Expression des gènes impliqués dans l’implantation embryonnaire et dans la formation du placenta chez le vison.....	202

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1.1	Le vison d'Amérique (<i>Mustela vison</i>).....	7
------------	---	---

Recensement de la littérature

Figure 2.1	Les isoformes du récepteur FGFR2.....	48
Figure 2.2	La synthèse des prostaglandines.....	50
Figure 2.3	Le mode d'action des récepteurs nucléaires.....	52
Figure 2.4	Le développement du placenta endothéliochorial chez le vison.....	54

Article premier

Figure 3.1	A trophoblast vesicle detaching from the monolayer of a trophoblast cell culture derived from a day 5 reactivated mink embryo.....	82
Figure 3.2	Progression of mink embryo expansion following reactivation by treatment of dams with PRL.....	84
Figure 3.3	Implantation occurred in all but a few mink after 13 days of daily prolactin administration, as seen in uterine section of an implantation chamber, stained with HPS.....	86
Figure 3.4	Incorporation of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrDU) was evaluated to determine DNA synthesis by mink embryos through the period of reactivation after obligate diapause.....	88

Figure 3.5	Protein synthesis in the embryo was assayed during the escape from diapause by determination of the incorporation of ³⁵ S-methionine.....	90
Figure 3.6	In vitro proliferation of trophoblast stem-like cells and embryonic stem-like cells from mink embryos.....	92
Figure 3.7	Occurrence of transcripts for fibroblast growth factor 4 (FGF4) and fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2) in embryos recovered at diapause and at 2 day intervals through day 11 after activation.....	94
Figure 3.8	Mean (\pm SEM) of the maximum diameters of trophoblast cell line colonies derived from embryos taken at day 5 after reactivation.....	96

Article deuxième

Figure 4.1	Partial cDNA sequence of mink progranulin, and homology between human, canine, mouse and mink progranulin sequences.....	125
Figure 4.2	Progranulin mRNA is expressed in mink trophoblast and endometrium around the time of embryo implantation.....	127
Figure 4.3	Progranulin protein is expressed in the trophoblast and endometrial cells in the mink pre-implantation and early implanted uterus.....	129
Figure 4.4	Progranulin protein localizes in the mink endometrium and trophoblast during the early post-implantation period.....	131
Figure 4.5	Progranulin protein is expressed in the trophoblast and the maternal hypertrophied endothelial cells in the early mink placenta.....	133

Article troisième

Figure 5.1	Trophoblast cultures express marker genes indicative of chorionic provenance of the cells	168
Figure 5.2	PPAR γ (a) and RXR α (b) mRNA localization by in situ hybridization on mink uteri.....	170
Figure 5.3	Immunocytochemical localization of PPAR γ and RXR α proteins at the implantation site, at days 0, 1 and 4 after implantation.....	172
Figure 5.4	The PPAR γ ligands 15-d-PGJ ₂ and troglitazone induce transcriptional activation of PPAR γ target-genes.....	174
Figure 5.5	The PPAR γ ligand 15-d-PGJ ₂ induces a) a change in trophoblast cell morphology and b) a decrease in cell proliferation activity in vitro	176
Figure 5.6	Treatment of trophoblast cells with 15-d-PGJ ₂ promotes a change in DNA complement.....	178
Figure 5.7	Treatment with 15-d-PGJ ₂ increases PPARG protein and mRNA and promotion of an attachment competent and potentially invasive trophoblast cell phenotype in the trophoblast cells.....	180
Figure 5.8	Adipophilin (<i>ADFP</i>) is a PPARG target gene in trophoblast cells..	182

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

15-d-PGJ ₂	15-deoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandine J ₂
AF-1, -2	Fonction d'activation-1, -2
ADFP	Adipophiline
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc, cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADRP	Protéine associée à la différenciation des adipocytes
AMF	Facteur de motilité autocrine
ANOVA	Analyse de la variance
AP-2	Protéine activatrice- 2
aP2	Protéine des adipocytes 2
AQP	Aquaporine
ARN, RNA	Acide ribonucléique
ARNm, mRNA	Acide ribonucléique messenger
BrDU	Bromodéoxyuridine
BRL49653	Rosiglitazone
BSA	Albumine de sérum bovin
CBP/p300	Protéine liant CREB
C/EBP	Protéine liant CCAAT/enhancer
COX	Cyclooxygénase
CY3	Cyanine 3
DAB	Diaminoabenzadine

DABCO	1,4-diazabicyclo(2,2,2) octane
DAPI	Diamidino-4'6-phenylindol-2 dichlorhydrate
DMPC	Dimethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DP	Récepteurs transactivés par PGD ₂
EDTA	Éthylène-diamine-tétraacétique
ECM	Matrice extracellulaire
EGF	Facteur de croissance épidermique
EP	Récepteurs transactivés par PGE ₂
ER	Récepteur d'oestrogènes
ErbB	Récepteur d'EGF
ERE	Élément de réponse du récepteur d'oestrogènes
Erk	Kinase régulée par un signal extracellulaire
ESC	Cellules souches embryonnaires
FACS	Séparation cellulaire activée par la fluorescence
FATP4	Protéine de transport des acides gras
FBS	Sérum foetal bovin
FGF4	Facteur de croissance fibroblastique- 4
FGFR (1-4)	Récepteur de facteur de croissance fibroblastique-1-4
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FP	Récepteurs transactivés par PGF2 α

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	Protéine fluorescente verte
GPI	Glucose-6-phosphate isomérase
HAT	Histone acétylase
HB-EGF	Facteur de croissance épidermique liant l'héparine
hCG	Hormone choriogonadotropine humaine
HDAC	Histone déacétylase
HETE	Acide hydroxy-eicosatétranoïque
HLP	Hormone lactogène placentaire
HODE	Acide hydroxy-octadédienoïque
HSP	Protéine activée par le choc thermique
HRP	Horseradish peroxidase
HSPG	Heparan sulfate protéoglycans
ICM	Masse cellulaire interne
Ig	Immunoglobuline
IP	Récepteurs transactivés par PGI ₂
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LIF	Facteur inhibiteur de la leucémie
NCoR	Corepresseur de récepteur nucléaire
OPN	Ostéopontine
PAF	Paraformaldéhyde

PGH	Hormone de croissance placentaire
PI	Iodide de propidium
PRL	Prolactine
PBP	Protéine liant PPAR
PBS	Saline tamponnée avec phosphate
PC cells	Prostate cancer cells
PCR	Réaction polymérase en chaîne
PG	Prostaglandine
PGC1	Coactivateur de PPAR γ - 1
PGI ₂	Prostacycline
PI	Propidium iodide
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de péroxisomes
PPRE	Élément de réponse pour PPAR
PRIP/RAP250	Protéine interagissant avec PPAR/protéine activatrice de récepteur250
RA	acide 9-cis-rétinoïque
RAR	Récepteurs d'acide rétinoïque
RNase	Ribonucléase
RT	Transcriptase inverse
RXR	Récepteur de rétinoïdes- X

SIBLING	<i>Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein</i>
SMRT	Méiateur du silencement des récepteurs de rétinoïdes et d'hormones thyroïdiennes
Sp1	Protéine de spécificité- 1
SR	Récepteurs d'hormones stéroïdiennes
SRC-1	Coactivateur de récepteurs stéroïdiens- 1
SSC	Sodium citrate standard
SSH	Hybridation soustractive suppressive
TBS	Saline tamponnée au tris
TGF α	Facteur de croissance de transformation- α
TR	Récepteurs d'hormones thyroïdiennes
tRNA	ARN de transfert
TSC	Cellules souches du trophoblaste
TZD	Thiazolidinédiones
VDR	Récepteurs de vitamine D
NTP	Nucléotide tri-phosphate
VEGF	Facteur de croissance endothelial vasculaire

À ma famille et mes amis

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Bruce D. Murphy, pour m'avoir communiqué sa passion et son dévouement pour la recherche, pour ses qualités humaines et ses bonnes valeurs, pour l'appui moral et les encouragements qu'il m'a fourni au cours de mes années d'études, je lui en serai toujours reconnaissante.

Je remercie bien sûr mes collègues de laboratoire et amis, Tatiana Ruiz-Cortès, Nicolas Gévry, Dan Lacroix, Richard Bennett, Sandra Ledoux, Éric Deneault, Flavia Lopes, Leonor Miranda Jimenez, Adrian Quero, Frédérick Guai, Pavine Lefèvre, Adriana Verduzco, Danila Campos, Catherine Dolbec, Vickie Roussel et Mira Dobias, sans lesquels le temps n'aurait pas passé aussi vite, et sans lesquels ma formation n'aurait pas été aussi complète.

Je suis également reconnaissante envers les employés et étudiants du CRRA, à mentionner Jacinthe Therrien, Carmen Léveillé, Alexander Boyer, Aron Cory, Khampoune Sayasith, Kristy Brown, Tania Fayad, Véronique Paradis, Mame Nahe Diouf, Kalidou N'Diaye, Mingju Cao, Edmir Nicola, Mélanie Hamel, Malha Sahmi, Érika Guerreiro, Joao Suzuki, Francisco Viramontes, Jae Gyu Yoo, Patrick Vincent, Isabelle Daneau, Manon Salvas, ainsi que tous ceux que j'ai cotoyé. Ces personnes ont donné au centre de recherche une énergie incroyable et ont su entretenir un milieu de travail sain et agréable pour tous. Un merci tout spécial à Micheline Sicotte, à Micheline St-Germain, à Diane

Rodier et à Odette Hélié, qui m'ont grandement aidée à travers mon cheminement. Leur contribution à la réussite des étudiants est indispensable.

Je ne peux pas oublier de remercier Arnaud Duval, François Fontaine, Norma Ybarra et Richard Graveline, avec qui j'ai passé des moments inoubliables, et les agents de sécurité de la Faculté, qui m'ont accompagnée et qui m'ont toujours encouragée pendant mes horaires de nuits et de fins de semaines. Merci également aux professeurs qui m'ont aidée et conseillée tout au long de mes études, Dr Goff, Dr Smith et Dr Pelletier.

Finalement, je suis éternellement reconnaissante envers ma famille, Diane, Normand et Pascale, pour m'avoir permis de me rendre là où je suis maintenant, pour m'avoir soutenue sur tous les plans dans mes choix, pour leurs encouragements et pour leur aide sans limites, et pour leur amour inconditionnel, je suis très fière de les avoir. Je remercie infiniment Simon-Pierre Demers, mon modèle à suivre en recherche, le petit étudiant à qui on promet tous un brillant avenir, avec qui je partage ma passion et ma vie. Il m'a accompagnée dans mes longues heures de travail, souvent la nuit et les fins de semaines, il a su me conseiller, me soutenir dans les épreuves au cours des dernières années et m'aider à devenir quelqu'un de meilleur.

1.0 INTRODUCTION

L'implantation de l'embryon est une étape critique de la gestation. Ce processus a lieu durant la fenêtre de réceptivité, un moment transitoire durant lequel une série d'événements embryonnaires et utérins hautement coordonnés se succèdent (Dey *et al.*, 2004). Chez les mammifères, les interactions foeto-maternelles qui régissent l'implantation embryonnaire ne sont pas encore bien connues. Chez plusieurs espèces de mustélidés dont le vison (*Mustela vison*, Figure 1.1), l'implantation est précédée d'un arrêt du développement de l'embryon, un événement désigné sous le nom de diapause embryonnaire. La diapause embryonnaire varie de un à plus de 60 jours sous conditions expérimentales chez le vison (Hansson, 1947; Enders, 1952; Murphy and James, 1974). Elle est de plus obligatoire, puisqu'elle se produit dans toutes les gestations (Mead, 1993). L'augmentation de la photopériode associée à l'équinoxe vernal et la sécrétion de prolactine par la glande hypophysaire de la mère qui s'ensuit sont les stimuli proximaux contrôlant la sortie de la diapause embryonnaire (revue par Lopes *et al.*, 2004). L'embryon du vison s'implante onze à treize jours suivant la sortie de la diapause (Lopes *et al.*, 2004). Bien que l'endocrinologie du contrôle maternel de la diapause chez le vison ait été bien étudiée jusqu'à maintenant, les interactions moléculaires qui ont lieu entre la mère et le fœtus ne sont que peu caractérisées.

Outre la diapause embryonnaire, le vison possède d'autres caractéristiques qui en font un modèle d'étude comparatif unique en son genre. L'une de ces caractéristiques est le placenta de type endothéliochorial, dans lequel les cellules fœtales sont en contact direct avec l'endothélium des vaisseaux sanguins maternels (Enders, 1957; Steven, 1975). La situation est différente chez la souris et l'humain, où l'on retrouve un placenta

haemochorial beaucoup plus invasif, dans lequel les cellules fœtales détruisent l'endothélium maternel pour établir un contact direct avec la circulation sanguine (Steven, 1975).

L'implantation chez le vison implique une succession d'événements. Le trophoblaste se différencie avant l'implantation pour acquérir des propriétés d'adhésion. Ceci résulte en la formation de plaques syncytiotrophoblastiques à quelques endroits sur le trophoctoderme, qui adhèrent à la paroi utérine et initient l'invasion (Enders and Schlafke, 1972). Du côté maternel, les cellules épithéliales prolifèrent et s'hypertrophient au site d'implantation du blastocyste au moment de l'implantation (Enders, 1957; Pfarrer *et al.*, 1999). Par la suite, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment au site du futur placenta (Lopes *et al.*, 2003; Pfarrer *et al.*, 2006) et les cellules endothéliales maternelles deviennent excessivement hypertrophiées dans la région du labyrinthe (Gulamhusein and Beck, 1973; 1975; Jones *et al.*, 1997; Krebs *et al.*, 1997; Backlin *et al.*, 1998a). Actuellement, on connaît très peu l'identité des facteurs impliqués dans la progression des événements menant à l'implantation et à la formation du placenta endothéliochorial chez les mustélidés. Nous avançons comme hypothèse générale dans cette étude que l'utilisation d'un modèle comparatif d'implantation différée permettrait l'identification des gènes impliqués dans les interactions foeto-maternelles, et d'élucider leur fonction dans l'implantation et la formation du placenta.

Dans la littérature, il a été décrit que les cellules de l'embryon de vison en diapause cessent de se répliquer, bien que l'embryon continue d'exercer ses fonctions métaboliques

basales (Gulyas and Daniel, 1967). Les événements qui se déroulent entre le moment de la sortie de la diapause et l'implantation ne sont cependant pas bien caractérisés chez le vison. C'est pourquoi notre premier objectif était de caractériser sur les plans de la taille, de la prolifération cellulaire et de la synthèse d'ADN et de protéines la progression du développement de l'embryon suite à sa sortie de la diapause. Nous avons également l'intérêt d'identifier des facteurs impliqués dans la prolifération des cellules embryonnaires.

La progranuline, ou le précurseur des granulines-épithélines (Zanocco-Marani *et al.*, 1999), est une glycoprotéine fortement exprimée dans les cellules épithéliales qui se divisent rapidement, telles que les entérocytes de la crypte intestinale profonde, et les kératinocytes (Daniel *et al.*, 2000). La progranuline est aussi impliquée dans la progression de certains types de tumeurs cancéreuses (Zhou *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1998b; He and Bateman, 1999; Daniel *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002), ce qui rappelle la progression du placenta dans l'utérus. Des études *in vitro* chez la souris ont d'ailleurs démontré que la progranuline stimule la prolifération des cellules du trophoblaste, ainsi que la cavitation et l'éclosion du blastocyste (Diaz-Cueto *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2005). L'expression de la progranuline est également retrouvée dans les cellules trophoblastiques du blastocyste, ainsi que dans les cellules déciduelles de l'endomètre de la souris (Diaz-Cueto *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2003). Ces évidences indiquent que la progranuline semble être un facteur important pour l'implantation, mais le patron d'expression spatio-temporelle de ce facteur de croissance au site d'implantation n'a été mis en évidence chez aucune espèce jusqu'à

présent. Notre second objectif était donc d'examiner le patron d'expression spatio-temporel de la progranuline durant l'implantation et la formation du placenta chez le vison.

L'importance des prostaglandines dans le processus d'implantation a été démontrée chez la souris dont le gène de la cyclooxygénase-2 (COX-2), codant pour l'enzyme limitante dans la synthèse des prostaglandines, a été inactivé (Lim *et al.*, 1997). Chez ces souris, il existe de nombreux problèmes ayant trait à la reproduction et parmi ceux-ci, on retrouve des défaillances associées à l'implantation et à la décidualisation (Lim *et al.*, 1997). Les patrons d'expression de l'ARNm et de la protéine de COX-2 ont été identifiés et décrits chez le vison et la mouffette tachetée. Les résultats de ces études indiquent que COX-2 semble jouer un rôle important dans l'implantation chez les carnivores également (Song *et al.*, 1998b; Das *et al.*, 1999). Une famille de récepteurs nucléaires pour les prostaglandines identifiée récemment est la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de péroxisomes (PPAR) (Giguere, 1999). Il a été démontré que PPAR β est un des médiateurs principaux des effets des prostaglandines durant la réaction de décidualisation chez la souris (Lim and Dey, 2002). Nous suggérons dans cet ouvrage que PPAR γ , un récepteur de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂ (15-d-PGJ₂), est impliqué dans la réaction d'implantation, et dans la médiation des effets des prostaglandines. Nos objectifs étaient de :

1. Démontrer le patron d'expression spatio-temporelle de PPAR γ et de son partenaire d'hétérodimérisation RXR α au site d'implantation;

2. Démontrer la spécificité des ligands de PPAR γ dans notre système in vitro de culture de cellules de trophoblaste en y introduisant au moyen de transfections un gène rapporteur dirigé par des éléments de réponse pour PPAR (PPRE) ;
3. Identifier les conséquences possibles de l'activation de PPAR γ dans les cellules du trophoblaste en vérifiant leur morphologie, leur prolifération et leur différenciation, et en examinant la régulation de l'expression de gènes marqueurs de la différenciation des cellules de trophoblaste sous l'influence des ligands pour PPAR γ et RXR α .

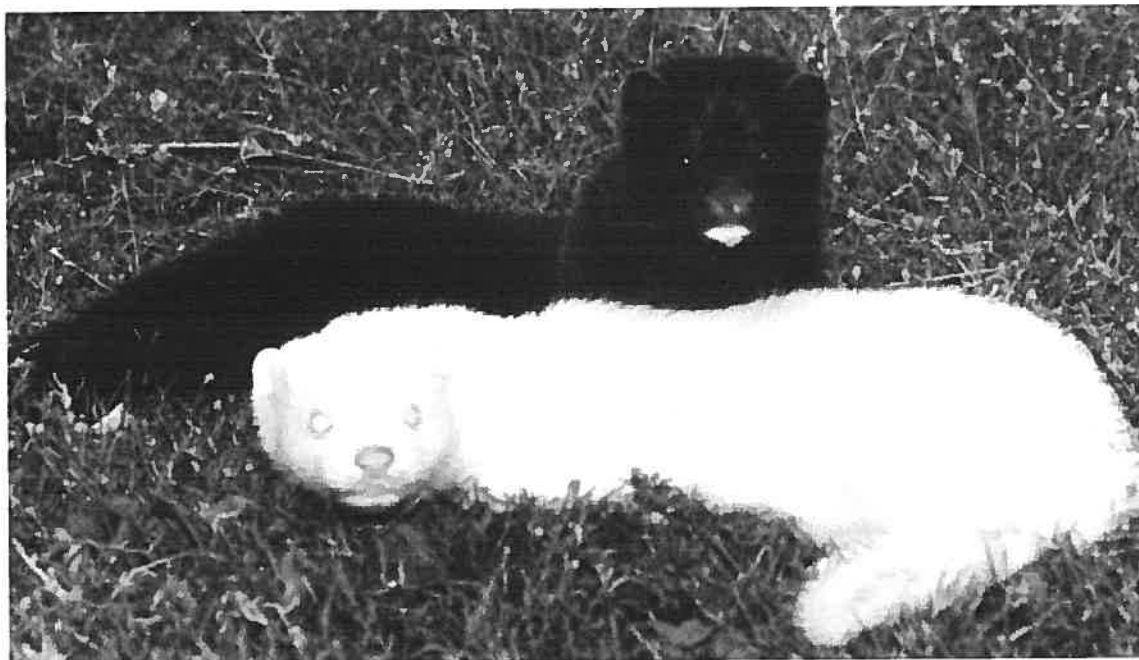


Figure 1.1 Le vison (*Mustela vison*) est élevé en captivité pour sa fourrure. Une caractéristique intéressante de cette espèce est l'implantation embryonnaire différée (Photo par Jian Hua Song et Bruce D. Murphy).

2.0 RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Le vison : Un modèle d'implantation différée

2.1.1 L'implantation différée

Le vison américain (*Mustela vison*) appartient à l'Ordre des carnivores et à la Famille des mustélidés. Comme le sable sibérien (*Martes zibellina*) et le furet européen (*Mustela putorius*), également membres de la Famille des mustélidés, le vison a été élevé de façon intensive en captivité pour sa fourrure (Murphy, 1988). Les biologistes de la reproduction se sont intéressés très tôt à cette espèce pour étudier la diapause embryonnaire, aussi désignée comme l'implantation différée, puisque l'embryon arrête son développement avant de s'implanter (Mead, 1993). En contrepartie, cette particularité n'est pas retrouvée chez le furet, une espèce apparentée au vison. L'ouvrage de Hansson fait référence pour la première fois de façon détaillée au phénomène de l'implantation différée chez le vison, en 1947 (Hansson, 1947).

2.1.2 Le développement embryonnaire

Le développement embryonnaire du vison se compare à celui du furet jusqu'au stade de blastocyste. L'ovulation, qui peut être induite à tout moment de la période des chaleurs par l'accouplement, suit la copulation de 30-36h chez le furet, et de 36-52h chez le vison (Robinson, 1918; Hammond and Walton, 1934; Hansson, 1947; Enders, 1952; Venge, 1959). Selon les études de Enders (Enders, 1952), l'ovule est fécondé dans les fimbriae de l'oviducte vers 53h post-coïtum chez le vison. Chez le furet, la fécondation semble avoir lieu dans la partie centrale de l'oviducte autour de 40h post-coïtum (Robinson, 1918; Hamilton, 1934). L'embryon amorce les premiers clivages vers 51h, atteint le stade

de la morula (16 cellules) peu avant 120h post-coïtum (Hamilton, 1934; Daniel, 1970), et le blastocyste entreprend son passage vers l'utérus au jour 7 ou 8 post-coïtum (Hamilton, 1934; Hansson, 1947; Enders, 1952; Murphy and Douglas, 1992). Durant le passage de l'embryon du vison de l'oviducte vers l'utérus, une capsule glycoprotéique se forme autour de la zone pellucide et le blastocyste comporte environ 300 cellules (Enders, 1952; Baevsky, 1963).

C'est à ce moment que le blastocyste du vison emprunte un chemin différent vers l'implantation. Le blastocyste du furet croît et s'implante à 12 jours post-coïtum (Enders and Schlafke, 1972). Quant au blastocyste du vison, il se maintient dans un état latent dont la durée varie de un à plus de 60 jours sous conditions expérimentales, avant de reprendre son développement et de s'implanter (Hansson, 1947; Enders, 1952; Murphy and James, 1974). Chez le furet comme chez le vison, la durée de la gestation post-implantation est de 28-30 jours (Hamilton, 1934; Hansson, 1947; Murphy and James, 1974). La durée de la gestation du furet est par conséquent de 42 jours (Hammond and Marshall, 1930), et celle du vison varie de 40 à 75 jours à cause de la diapause embryonnaire (Enders, 1952).

Les cellules du blastocyste en diapause cessent de se répliquer mais maintiennent un niveau d'activité métabolique basal, car la consommation d'oxygène par les cellules du blastocyste est active (Gulyas and Daniel, 1967). Des évidences montrent qu'il n'y a pas de synthèse de molécules d'ADN ou d'ARN pendant la diapause chez le vison *in vitro* (Gulyas and Daniel, 1969; Gulyas *et al.*, 1969). La synthèse protéique semble toutefois avoir lieu, mais à un rythme beaucoup plus lent que celui d'un embryon qui n'est pas en diapause (Gulyas and Daniel, 1969).

2.1.3 Les variations sur le thème de la diapause

Le vison n'est pas la seule espèce de mammifère où l'on retrouve l'implantation différée. Ce trait est communément observé chez plusieurs espèces carnivores, notamment dans quatre Familles: Mustelidae, Ursidae, Phocidae, et Otariidae (Mead, 1993). Ce trait est aussi retrouvé chez d'autres espèces non-apparentées, comme chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le tatou (*Dasypus novemcinctus*), et certaines espèces de chauves-souris (Mead, 1993). Chez ces espèces, la diapause embryonnaire est qualifiée d'obligatoire parce qu'elle se produit dans toutes les gestations.

Par opposition à l'implantation différée obligatoire, l'implantation différée facultative ou nutritionnelle est employée comme une stratégie de reproduction chez certaines espèces de mammifères qui présentent un estrus post-partum (Mead, 1993). La diapause facultative est caractéristique de certaines espèces de marsupiaux et de rongeurs, ainsi que d'animaux de l'Ordre des insectivores (Mead, 1993). Chez ces espèces, la lactation des nouveaux-nés induit la diapause des embryons non-implantés de la portée suivante. L'hypothèse actuelle stipule que l'implantation différée facultative est une stratégie qui permet d'assurer un développement post-natal optimal, ainsi que la survie de l'espèce dans des conditions environnementales défavorables (Mead, 1993; Renfree and Shaw, 2000; Lopes *et al.*, 2004). Chez certains marsupiaux macropodidés, une diapause saisonnière ou obligatoire peut coïncider avec une implantation différée facultative (Renfree and Shaw, 2000; Lopes *et al.*, 2004).

Chez les espèces à diapause obligatoire, la disponibilité des ressources alimentaires et la naissance des descendants dans des conditions environnementales favorables semblent

être des explications à l'évolution de ce phénomène (Mead, 1993; Renfree and Shaw, 2000; Lopes *et al.*, 2004). Les facteurs contrôlant l'entrée et la sortie de la diapause embryonnaire chez ces espèces ne sont cependant pas entièrement connus jusqu'à ce jour.

2.2 Le contrôle endocrinien de la sortie de diapause obligatoire et de l'implantation

2.2.1 Le contrôle maternel

Il est maintenant établi que chez le vison, l'entrée et la sortie de la diapause embryonnaire ne sont pas causées par des facteurs propres à l'embryon. Il s'agit plutôt d'un contrôle maternel de la diapause qui s'exerce sur l'embryon. Ceci a été mis en évidence par Chang (Chang, 1968) lorsqu'il a effectué un transfert réciproque des embryons entre le vison et le furet, le furet étant une espèce apparentée au vison mais qui ne présente pas de diapause embryonnaire. L'embryon de vison en arrêt de développement reprend son activité normale dans l'utérus du furet, et inversement, l'embryon du furet entre en diapause lorsque transplanté dans l'utérus du vison. De façon similaire, il a été démontré que les embryons en diapause reprennent leur développement lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* avec des cellules utérines de vison (Moreau *et al.*, 1995; Polejaeva *et al.*, 1997).

2.2.2 Les stimulus environnementaux

La photopériode est un stimulus environnemental qui influence la reprise de l'activité sexuelle mâle et femelle chez les mammifères à reproduction saisonnière, comme le vison (Lopes *et al.*, 2004). Des études démontrent que le prolongement de la photopériode durant l'équinoxe vernal influence la sortie de la diapause embryonnaire et

l'initiation de l'implantation chez le vison (Duby and Travis, 1972; Murphy and James, 1974; Martinet *et al.*, 1981; Sundqvist *et al.*, 1988) et la moufette tachetée (Mead, 1971), deux espèces chez lesquelles la diapause obligatoire est bien documentée. Induit expérimentalement durant la diapause, le prolongement de la photopériode a pour effet de raccourcir la durée de la gestation (Pearson and Enders, 1944; Garcia Mata, 1984) et de causer prématurément la sortie de la diapause et l'implantation (Murphy and James, 1974). L'ablation des photorécepteurs chez la femelle vison (Murphy and James, 1974) ou le maintien de celle-ci dans des conditions de noirceur totale (Sundqvist *et al.*, 1989) durant la période de la diapause embryonnaire n'empêchent cependant pas l'implantation d'avoir lieu, ce qui indique que certains signaux endogènes à la mère peuvent aussi contrôler le moment de sortie de la diapause et de l'implantation (Mead, 1989; Lopes *et al.*, 2004).

L'implication de la glande pinéale, ou épiphyse, dans le contrôle de la reprise du développement embryonnaire après la diapause a été mise en évidence par une expérience de dénervation de la glande pinéale par ganglionectomie cervicale chez des femelles en diapause. Ce court-circuit avait pour effet d'empêcher la régulation de la reprise du développement des embryons lors du prolongement de la photopériode (Murphy and James, 1974; Murphy *et al.*, 1990). La mélatonine est une indoléamine produite par la glande pinéale qui influence plusieurs aspects de la reproduction (Sundqvist *et al.*, 1989). Chez le vison, la mélatonine est sécrétée selon le cycle circadien, et la fréquence de libération de la mélatonine augmente en conditions de courtes photopériodes (Papke *et al.*, 1980; Martinet *et al.*, 1981), ce qui a pour effet d'inhiber la sécrétion de la prolactine par la glande hypophysaire (Curlewis, 1992). Le traitement chronique de la femelle vison avec la

mélatonine interfère avec la sortie de la diapause, l'implantation, ainsi qu'avec l'augmentation normale des concentrations plasmatiques de prolactine durant l'équinoxe vernal (Martinet and Allain, 1985; Murphy *et al.*, 1990).

2.2.3 L'axe gonado-hypophysaire

La prolactine est un facteur clé dans le contrôle de la diapause chez les mustélidés (Lopes *et al.*, 2004). Les concentrations plasmatiques de cette hormone augmentent juste avant l'implantation chez le vison et la moufette tachetée (Murphy and Rajkumar, 1985; Mead, 1993). La prolactine est une hormone hypophysaire qui est sous contrôle dopaminergique (Papke *et al.*, 1980; Martinet *et al.*, 1981; Murphy *et al.*, 1981). Lorsque l'action de cette hormone est bloquée (Papke *et al.*, 1980; Martinet *et al.*, 1981), ou lorsque que l'hypophyse est retirée (Murphy and Moger, 1977), l'embryon ne parvient pas à s'implanter. Chez les animaux hypophysectomisés, les injections répétées de prolactine peuvent restaurer l'implantation (Murphy *et al.*, 1981). Chez les animaux en diapause, la prolactine et la pimozide, un antagoniste de la dopamine qui induit la sécrétion de prolactine, induisent l'implantation (Papke *et al.*, 1980; Murphy, 1983). La prolactine est donc essentielle à l'implantation de l'embryon et est vraisemblablement l'effecteur hypophysaire des effets de la photopériode.

Chez la plupart des espèces de mammifères, la prolactine, en plus d'exercer une importante activité lactotrophe sur les glandes mammaires, exerce une activité lutéotrophe sur le corps jaune. Cette action lutéotrophe est observée chez les carnivores dont le chien (Concannon *et al.*, 1981), le vison (Papke *et al.*, 1980; Murphy *et al.*, 1981) et le furet (Murphy, 1979). Par exemple, la prolactine réactive le corps jaune chez les visons

hypophysectomisés en diapause (Murphy *et al.*, 1981). Chez les visons en diapause, elle induit également une augmentation des concentrations plasmatiques de progestérone (Papke *et al.*, 1980; Martinet *et al.*, 1981), principale hormone produite par les cellules lutéales du corps jaune.

2.2.4 Les facteurs ovariens

L'importance des facteurs ovariens dans la sortie de la diapause et l'implantation a été démontrée par une série d'expériences chez le vison. L'ovariectomie effectuée durant la diapause empêche l'embryon de reprendre son développement et de s'implanter (Murphy *et al.*, 1982; Murphy *et al.*, 1983). L'administration de progestérone chez les femelles ovariectomisées (Hansson, 1947; Murphy *et al.*, 1983) ou en diapause (Hammond, 1951; Holcomb, 1967) ne suffit pas cependant à induire l'implantation. Ceci suggère que d'autres facteurs lutéaux sont requis pour l'implantation. Chez le furet, l'implantation n'a pas lieu si les ovaires sont retirés quelques jours avant l'implantation, ou si l'hypophyse est manquante (Murphy, 1979). Mead et Foresman (Foresman and Mead, 1978) ont suggéré que des facteurs lutéaux autres que la progestérone étaient requis pour l'implantation chez le furet. Un candidat potentiel est l'enzyme glucose-6-phosphate isomérase (GPI), aussi désignée comme le facteur de motilité autocrine (AMF), sécrété par le corps jaune du furet durant la fenêtre d'implantation (Schulz and Bahr, 2003). L'immunisation passive contre ce facteur empêche partiellement l'implantation chez le furet (Schulz and Bahr, 2003).

Les niveaux de progestérone commencent à augmenter environ 40 jours avant la mise bas chez le vison (Moller, 1973), et cette augmentation correspond avec la sortie de la diapause embryonnaire et l'équinoxe vernal du mois de mars dans l'hémisphère Nord

(Moller, 1973; Allais and Martinet, 1978; Pilbeam *et al.*, 1979; Martinet *et al.*, 1981). La progestérone atteint son pic de sécrétion juste après l'implantation (Murphy and Moger, 1977), et les niveaux déclinent graduellement par la suite jusqu'au niveau basal, peu après la mise bas (Stoufflet *et al.*, 1989). Les niveaux plasmatiques d'œstrogène diminuent par contre après l'accouplement, et restent bas pendant la gestation et la lactation (Pilbeam *et al.*, 1979; Stoufflet *et al.*, 1989).

Chez les souris et les rats, l'oestrogène induit l'implantation lorsqu'elle est administrée aux animaux lors de la diapause facultative. De façon expérimentale, l'ovariectomie pratiquée juste avant l'implantation, couplée à un traitement à la progestérone, induit l'état de diapause dans les embryons (Nutting and Meyer, 1963; Yoshinaga and Adams, 1966; Psychoyos, 1973; Dey *et al.*, 2004), et une seule dose d'œstrogène peut initier l'implantation chez ces animaux (Yoshinaga and Adams, 1966; Psychoyos, 1973; Dey *et al.*, 2004). L'arrêt de la lactation des jeunes nourrissons induit naturellement la reprise du développement du blastocyste et l'implantation chez la souris et le rat (Bindon, 1969; 1970). Chez les visons, une injection d'œstrogène ne suffit pas à causer la sortie de la diapause et à induire l'implantation (Hansson, 1947; Murphy *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1993). Ceci illustre qu'il peut y avoir une variation considérable dans les mécanismes qui contrôlent l'initiation de l'implantation selon les espèces.

2.3 L'implantation et la formation du placenta

2.3.1 La réaction d'implantation

L'implantation est définie comme le processus pendant lequel le blastocyste entre en contact physique et physiologique avec l'endomètre utérin (Dey *et al.*, 2004). On reconnaît trois stages successifs du processus d'implantation, qui s'appliquent particulièrement aux rongeurs. Le premier est l'apposition, lorsque le trophoctoderme s'appose à l'épithélium luminal de l'endomètre, le deuxième est l'adhésion, lorsque le contact entre le trophoctoderme et l'épithélium de l'endomètre est suffisamment solide pour résister à une pression physique sans déloger l'embryon, i.e. après un lavage d'utérus, et le troisième est la pénétration, lorsque le trophoblaste commence son invasion dans l'épithélium utérin (Schlafke and Enders, 1967; Enders and Schlafke, 1969).

Chez les rongeurs, le premier changement physiologique que subit l'utérus avant la phase d'attachement est l'augmentation de la perméabilité vasculaire au site du blastocyste, tel que démontré à l'aide d'un colorant bleu injecté dans les veines, qui diffuse hors des capillaires lorsque la perméabilité des vaisseaux utérins augmente (Psychoyos, 1973; Rogers *et al.*, 1982; Takemori *et al.*, 1984; Weitlauf, 1994). Les prostaglandines sont impliquées dans cette augmentation de perméabilité des capillaires (revue par Kennedy, 1983), mais chez les visons, aucune évidence n'indique que ce phénomène ait lieu avant l'implantation (Song, 1998).

Suivant l'apposition du blastocyste, les cellules stromales qui entourent le blastocyste entrent dans une phase de prolifération et de différenciation, c'est ce qu'on appelle la réaction de décidualisation (Dey, 1996). L'utérus augmente en poids et en

diamètre, et une réaction d'inflammation locale au niveau du blastocyste peut être observée (Weitlauf, 1994). Les cellules déciduelles sont polyploïdes et binucléées (Sachs and Shelesnyak, 1955), et secrètent des produits peptidiques et stéroïdiens (Weitlauf, 1994).

La réaction de décidualisation est caractéristique des rongeurs, de certains primates et d'espèces insectivores, mais elle ne semble pas avoir lieu chez les espèces carnivores, exception faite du chat (Leiser and Koob, 1993). Chez le vison, il y a transformation de l'épithélium lors de l'attachement du blastocyste, mais il n'existe pas de cellules homologues aux cellules stromales déciduelles des rongeurs (Mossman, 1937; Enders, 1957).

2.3.2 La fenêtre de réceptivité

La fenêtre d'implantation chez les souris et les rats est déterminée par un processus coordonné de prolifération et de différenciation des cellules utérines, processus qui est contrôlé par la progestérone et l'œstrogène (Gupta *et al.*, 1989). La période de réceptivité de l'utérus est très brève, et doit être synchronisée parfaitement avec le développement de l'embryon pour que l'implantation ait lieu. Par conséquent, durant la phase pré-réceptive et la phase réfractaire (ou post- réceptive), l'utérus ne permet pas l'attachement du blastocyste (Psychoyos, 1973; Dey, 1996). Chez les espèces présentant le délai d'implantation comme le vison, la phase de réceptivité correspond avec la reprise du développement, suivant la sortie de diapause (Hansson, 1947; Murphy and James, 1974; Stoufflet *et al.*, 1989).

2.3.3 Généralités sur le placenta

L'évolution du placenta chez les euthériens a permis de favoriser les échanges de gaz et de nutriments entre la mère et le fœtus sur une période prolongée, et d'offrir une protection supplémentaire au fœtus face à l'environnement. Le placenta est un organe à durée de vie limitée, formé suite à l'implantation du blastocyste. Le blastocyste comprend les cellules du bouton embryonnaire qui contribueront à l'embryon, aux membranes extra-embryonnaires et au placenta, et les cellules du trophoctoderme, qui ne contribueront qu'au placenta. Durant le développement post-implantation du fœtus, le placenta choriovitellin ou omphalopleure bilaminaire, est le premier à se former lorsque l'endoderme du sac vitellin établit contact avec le trophoblaste. L'allantois s'appose ensuite au trophoblaste à son tour pour former le placenta chorioallantoïque, ou omphalopleure trilaminaire (Carter and Enders, 2004). Chez certains mammifères dont les espèces carnivores, le placenta chorioallantoïque finit par remplacer le placenta choriovitellin. Chez d'autres, le placenta choriovitellin persiste jusqu'à terme, et est vascularisé par les vaisseaux fœtaux (Carter and Enders, 2004).

2.3.4 Classification du placenta du vison au niveau macroscopique

Les critères de classification des différents types de placenta sont généralement basés sur le degré d'invasion et de destruction des tissus maternels, et sur l'intensité des interactions entre la mère et le fœtus. Sur la base des critères morphologiques, on reconnaît aujourd'hui 4 types de placenta qui ont été décrits pour la première fois par Fabricius en 1604, tel que rapporté par Steven (Steven, 1975).

Le placenta diffus, est caractérisé par un chorion recouvert de petites villosités en contact intime avec l'épithélium utérin. On le retrouve entre autres chez le cheval et le porc. La majorité des ruminants dont la vache, le mouton et la chèvre, possèdent quant à eux un placenta cotylédonaire ou multiplexe. Dans ce cas, des petites régions circulaires comprenant des villosités faisant contact avec l'épithélium utérin sont dispersées parmi de grandes surfaces de chorion lisse.

Le placenta zonaire est caractéristique des espèces carnivores (Figure 2.1a). Dans ce type de placenta, les villosités ou lamelles chorioniques, sont disposées en une bande ceinturant le sac chorionique. Complète chez le chat, le chien et la hyène tachetée, cette ceinture est incomplète chez le furet, l'ours polaire, l'ours brun, le raton laveur, le vison et certains pinnipèdes (revue par Steven, 1975). Des effusions sanguines marginales (Figure 2.1a) ou centrales sont retrouvées chez les espèces à placenta zonaire. Le vison, comme le furet et la mouffette tachetée, possèdent une effusion centrale (Steven, 1975). La région de l'effusion, ou région hémophagique, est un endroit où il y a accumulation de sang de provenance maternelle, qui aurait comme fonction d'approvisionner l'embryon en fer et en protéines (Carter and Enders, 2004).

Le quatrième type de placenta, le placenta discoïde, est retrouvé entre autres chez les humains, les lagomorphes, les chauves-souris, les insectivores et les rongeurs. Il peut être simple ou double. Ce type de placenta est décrit de la même façon que le placenta zonaire, mais ne comporte généralement pas d'organe hémophagique. Selon Hansson (Hansson, 1947), le placenta du furet devient bidiscoïdal en fin de gestation, et le placenta

discontinu du vison devrait plutôt être qualifié de zonodiscoïdal, étant donné que le trophoblaste ne forme pas de villosités dans la région mésométriale.

2.3.5 Classification du placenta au niveau microscopique

La classification de Grosser des types de placentas est fondée sur le nombre de couches de tissus séparant la circulation fœtale de la circulation maternelle (Steven, 1975). Suivant cette classification, le placenta épitheliochorial est le moins invasif étant donné que toutes les couches de tissus maternels sont conservées. Il comporte donc trois couches fœtales (l'endothélium des capillaires fœtaux, le mésenchyme ou tissu connectif et l'épithélium chorionique), et trois couches maternelles (l'épithélium utérin, le tissu connectif et l'endothélium). Ce type est associé surtout au placenta diffus du cheval et du porc. Le placenta syndesmochorial, retrouvé chez la majorité des ruminants, est caractérisé par une fusion de l'épithélium maternel et du trophoblaste. Le placenta endotheliochorial, typique des espèces carnivores, comprend seulement l'endothélium du côté maternel. Finalement, le placenta haemochorial des humains, des primates et des rongeurs perd les trois couches de tissus maternels.

2.3.6 L'implantation par déplacement épithélial

L'implantation par déplacement épithélial chez les *Mustelidae* a été décrite de façon détaillée avec les modèles du furet et de la moufette tachetée (Enders and Schlafke, 1972; Enders and Mead, 1996). Chez le furet à la veille de l'implantation, des projections trophoblastiques pénètrent la capsule glycoprotéique qui recouvre l'embryon à quelques endroits, suite à une action phagocytaire des cellules trophoblastes, à une dissolution

localisée de la capsule glycoprotéique, et à des forces mécaniques exercées par l'expansion du blastocyste (Enders and Schlafke, 1972). Avant que l'implantation n'ait lieu, le trophoblaste est composé d'une seule couche de cellules squameuses, mais juste avant l'attachement, les cellules du trophoblaste deviennent plus larges à certains endroits, et des plaques de syncytium y sont formées (Figure 2.1b). La formation des plaques syncytiotrophoblastiques au moment de l'adhésion est une stratégie d'adhésion à la paroi utérine adoptée par les mustélidés (Enders and Schlafke, 1972; Enders and Mead, 1996). Au jour 13 post-coïtum chez le furet (jour de l'implantation), les plaques syncytiotrophoblastiques deviennent de plus en plus nombreuses et recouvrent une surface continue d'épithélium luminal de l'endomètre.

Par la suite, le syncytiotrophoblaste pénètre l'épithélium utérin en projetant un mince repliement cytoplasmique entre deux cellules épithéliales. C'est la pénétration épithéliale par le trophoblaste (Figure 2.1b). L'épithélium glandulaire et luminal sont à ce stade en phase de prolifération, et aucun symplasma n'est encore présent à ce stade, même si on peut y observer des cellules élargies (Enders and Schlafke, 1972; Enders and Mead, 1996).

2.3.7 La placentogénèse

Au 2^e jour suivant l'implantation chez le furet, le syncytium a entouré et phagocyté en grande partie l'épithélium luminal. Les cellules du cytotrophoblaste prolifèrent rapidement et forment une couche stratifiée. Lors de cette prolifération, des colonnes cellulaires progressent à l'intérieur du syncytiotrophoblaste, et ces colonnes deviendront les villosités chorioniques (Gulamhusein and Beck, 1973; 1975). Des changements similaires

ont été observés chez le vison (Enders, 1957; Pfarrer *et al.*, 1999) et la moufette (Elbrecht *et al.*, 1996).

On peut également observer dès le jour 2 de l'implantation chez le furet les premiers changements symplasmiques au niveau des cellules du col des glandes endométriales (Gulamhusein and Beck, 1973; 1975). L'épithélium des glandes est dilaté et hypertrophié au site d'invasion. Des masses symplasmiques se forment à mesure que le syncytium avance dans l'endomètre (Figure 2.1c). Dans la région profonde de l'endomètre, les glandes restent cependant intactes. Ces masses symplasmiques servent de substance histotrophe au fœtus (Gulamhusein and Beck, 1973; 1975). Chez le vison et la moufette tachetée, la formation de ces masses est également rapportée (Enders, 1957; Enders and Mead, 1996; Pfarrer *et al.*, 1999).

Durant la période qui suit l'implantation, le facteur VEGF est induit dans les cellules stromales et trophoblastiques, pour stimuler l'activité angiogénique dans l'utérus du vison (Winther and Dantzer, 2001; Lopes *et al.*, 2003). La néovascularisation du placenta chez le vison a été décrite par Winther *et al.* (Winther *et al.*, 1999). Dès le début de la gestation, les cellules endothéliales maternelles se répliquent vigoureusement par mitose. Vers la mi-gestation, environ au jour 20 post-coïtum, les cellules endothéliales s'hypertrophient, et des cellules péri-endothéliales apparaissent. L'hypertrophie des cellules endothéliales maternelles est aussi observée chez d'autres espèces carnivores, mais est particulièrement marquée chez le vison (Gulamhusein and Beck, 1973; 1975; Jones *et al.*, 1997; Krebs *et al.*, 1997; Backlin *et al.*, 1998b). C'est également environ au jour 20 de la gestation que les vaisseaux fœtaux vascularisent le mésenchyme fœtal, au cœur des

villosités chorioniques (Strahl and Ballmann, 1915). La circulation maternelle est alors séparée de la circulation fœtale par l'endothélium maternel hypertrophié, le syncytiotrophoblaste, le cytotrophoblaste et l'endothélium fœtal (Steven, 1975).

2.3.8 Les zones du placenta

Selon Enders, quatre zones composent le placenta du vison : La zone allantochorionique, le labyrinthe, la zone de transition et la zone basale ou déciduelle (Enders, 1957). Le labyrinthe est villeux chez le vison (Krebs *et al.*, 1997), plutôt que lamellaire comme chez le furet (Enders and Schlafke, 1972) ou la loutre de mer (Sinha and Mossman, 1966). Le placenta lamellaire est sommairement défini comme étant constitué de cellules trophoblastiques qui délimitent le tissu maternel, que se soit un sinus rempli de sang, ou les capillaires entourés de leurs cellules endothéliales. Dans le placenta villeux par contre, le trophoblaste se développe sous la forme de villosités qui se développent à partir du chorion. Ces villosités renferment le mésenchyme fœtal ainsi que les vaisseaux fœtaux. Elles sont délimitées par les cellules du cytotrophoblaste et par le syncytiotrophoblaste (Figure 2.1c). Les capillaires fœtaux pénètrent dans le syncytiotrophoblaste pour établir le contact avec le tissu maternel et permettre ainsi les échanges foeto-maternels (Steven, 1975).

Le trophoblaste s'attache faiblement à l'endomètre dans la zone de transition (Figure 2.1d), mais s'attache surtout aux compartiments de matière cytolitique provenant des cellules maternelles transformées en masses symplasmiques. La matière cytolitique est composée de débris cellulaires, de sang effusé, de masses symplasmiques, de cellules en

cours de désintégration, de lipides, et d'autres composantes cellulaires et sanguines (Enders, 1957).

L'endomètre profond, peu modifié, constitue la couche déciduelle basale (Figure 2.1d). Cette zone est principalement composée des parties profondes des glandes, faites d'épithélium compacte. En s'approchant de la zone de transition, on observe des glandes étirées, des masses symplasmiques et des cellules à noyaux géants (Enders, 1957). Étant donné que la séparation entre les tissus maternels et fœtaux est claire chez le vison, on parle de placenta non-déciduel ou adécidué. Lorsqu'une quantité substantielle de tissus maternels est emportée lors de la mise-bas, on parle plutôt de placenta déciduel (Steven, 1975).

2.4 Les interactions foeto-maternelles impliquées dans le contrôle de l'implantation

Très peu de facteurs ont jusqu'à maintenant été identifiés comme étant impliqués dans l'implantation chez le vison et les autres espèces carnivores. Les connaissances sont surtout acquises chez la souris qui, avec la technologie de culture des cellules souches embryonnaires et de l'inactivation ciblée de gènes, permet d'obtenir des modèles génétiques pour étudier la fonction des gènes dans l'implantation. Nous passons en revue quelques gènes qui ont été identifiés comme importants pour l'implantation et qui seront étudiés plus en profondeur par la suite dans le présent travail.

2.4.1 L'oestrogène

L'inactivation chez la souris du récepteur oestrogénique- α (ER α), normalement exprimé dans l'endomètre autour de la période d'implantation, rend l'embryon incapable de

s'implanter (Tan *et al.*, 1999; Curtis Hewitt *et al.*, 2002), et cet échec n'est pas causé par une défaillance de la réaction de décidualisation (Paria *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999). Il a été suggéré que l'action de l'oestrogène serait davantage liée à la réaction d'attachement du blastocyste à la paroi utérine (Das *et al.*, 1997).

Au niveau des embryons en diapause ou réactivés, les récepteurs de l'oestrogène sont exprimés (Hou *et al.*, 1996), mais ne semblent pas être requis pour la réactivation étant donné que l'oestrogène ne rend pas l'embryon compétent pour l'implantation *in vitro* (Paria *et al.*, 1998b). Les catéchol-oestrogènes sont des molécules qui peuvent inférer une réponse oestrogénique dans l'utérus sans activer les ER (Das *et al.*, 1997), et sont capables de rendre l'embryon compétent pour l'implantation *in vitro* contrairement à l'oestrogène (Paria *et al.*, 1998b). Ceci suggère que l'oestrogène peut agir de deux façons dans l'utérus : Le pic d'oestrogène requis pour l'implantation transactive les ER afin de provoquer l'activation de l'utérus, et les catéchol-oestrogènes sont synthétisés par l'utérus et sont responsables de l'activation de l'embryon, indépendamment des ER (Paria *et al.*, 1998a; Dey *et al.*, 2004). Chez les carnivores, le rôle des oestrogènes n'est pas bien connu dans l'activation de l'utérus et dans la reprise de l'activité mitotique embryonnaire.

2.4.2 Le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF)

Dans plusieurs tissus, LIF est une cytokine qui régule la prolifération, la différenciation et la fonction cellulaire (Smith *et al.*, 1992). Le pic d'oestrogène nécessaire à l'implantation chez le rat et la souris induit de façon transitoire l'expression de LIF dans l'épithélium glandulaire de l'endomètre (Bhatt *et al.*, 1991), et LIF, injecté chez la souris,

peut récapituler les effets de l'oestrogène sur l'implantation (Sherwin *et al.*, 2004). De plus, les femelles souris déficientes en *LIF* produisent des embryons normaux, mais ces embryons ne peuvent s'implanter normalement (Stewart *et al.*, 1992). L'injection péritonéale ou intrautérine de LIF peut alors restaurer l'implantation (Stewart *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2000). Chez la majorité des espèces cependant, LIF semble plutôt être régulé par la progestérone (Dey *et al.*, 2004). Chez les carnivores, l'induction de l'expression de LIF dans l'utérus correspond de plus avec la sortie de la diapause (Song *et al.*, 1998a; Hirzel *et al.*, 1999). Il est donc possible que le LIF produit par l'endomètre régule la sortie de la diapause de l'embryon chez le vison et soit nécessaire à l'implantation.

2.4.3 Les facteurs de croissance épidermaux (EGF)

EGF est un facteur de croissance qui est capable d'induire la sortie de la diapause embryonnaire car son administration chez le rat remplace le pic d'oestrogène normalement requis pour l'implantation (Johnson and Chatterjee, 1993). Das *et al.* (Das *et al.*, 1994) ont rapporté l'expression du facteur de croissance épidermique liant l'héparine (HB-EGF), un membre de la grande famille des EGF, exclusivement aux sites d'implantation plusieurs heures avant l'implantation chez la souris. L'expression de l'amphiréguline, aussi de la famille des EGF, est également induite au niveau de l'épithélium luminal à proximité du blastocyste juste avant l'implantation, et est absente le lendemain du jour de l'implantation chez cette espèce (Das *et al.*, 1995). Au niveau du blastocyste, l'expression des récepteurs de facteurs de croissance de la famille des EGF, ErbB1 et ErbB4, est induite lorsque l'embryon reprend son développement et initie l'implantation (Paria *et al.*, 1993; Fassler

and Meyer, 1995; Hamatani *et al.*, 2004). Ces évidences suggèrent que les facteurs de la famille des EGF et leurs récepteurs sont impliqués dans la reprise du développement embryonnaire et dans l'implantation chez les rongeurs (Dey *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2004). Chez les carnivores, les récepteurs des EGF sont présents au niveau de l'embryon et leur activité est associée à la sortie de diapause, tel qu'illustré par les recherches menées sur la moufette tachetée (Paria *et al.*, 1994).

2.4.4 Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF)

Au moins 22 membres de la famille des FGF ont été identifiés dans une variété d'organismes, allant des nématodes aux humains (revue par Ornitz and Itoh, 2001). Durant le développement embryonnaire chez la souris, les FGF influencent la morphologie embryonnaire et sont impliqués dans diverses réponses cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et la migration. Chez les adultes, cette famille de facteurs est importante pour le contrôle du système nerveux, la réparation tissulaire, la guérison des plaies et l'angiogénèse tumorale (revue par Givol *et al.*, 2003). L'activité des FGF est médiée par des récepteurs tyrosine kinase appartenant à 4 familles : FGFR1 à FGFR4 (Lee *et al.*, 1989; Givol and Yayon, 1992; Jaye *et al.*, 1992). La liaison des FGF à ces récepteurs peut être assistée par la liaison des FGF aux protéines de la famille des *Heparan sulfate protéoglycans* (HSPG) (Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991; Ornitz *et al.*, 1992; Spivak-Kroizman *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1999). Les récepteurs pour les différents FGF sont composés, tout comme les autres récepteurs tyrosine kinase, d'un domaine extracellulaire de liaison aux ligands, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine

cytoplasmique à activité tyrosine kinase, et de séquences régulatrices additionnelles (Hunter, 2000; Schlessinger, 2000). Le domaine extracellulaire, pour sa part, comprend trois domaines *immunoglobulin-like* (*Ig-like*) nommés D1 à D3, et contient un site de liaison à l'héparine (Schlessinger, 2000).

Deux isoformes existent pour le récepteur FGFR2, et ils sont générés par épissage alternatif du domaine *Ig-like* D3 (aussi nommé III). Trois exons codent pour le domaine D3 : L'exon 7 (ou a) code pour la partie N-terminale et les exons 8 (ou b) et 9 (ou c) codent alternativement pour la partie C-terminale, ce qui résulte en deux isoformes, FGFR2 IIIb et FGFR2 IIIc (Figure 2.2). Ces deux isoformes possèdent des affinités différentes pour les ligands. Par exemple, l'isoforme FGFR2 IIIb se lie à FGF1, 3, 7, 10, 22, et l'isoforme FGFR2 IIIc se lie avec FGF1, 2, 4, 6, 9, 17, 18 (Miki *et al.*, 1992; Yayon *et al.*, 1992; Eswarakumar *et al.*, 2005).

Il a été démontré que FGF4 et son récepteur FGFR2 (IIIc) sont impliqués dans l'implantation, étant donné que l'inactivation ciblée de ces protéines causent une mortalité embryonnaire approximativement au moment de l'implantation (Niswander and Martin, 1992; Orr-Urtreger *et al.*, 1993; Feldman *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998c). FGF4 est exprimé tôt par le génome du de l'embryon, plus précisément au stade de 2 cellules, et reste présent pendant le développement ultérieur à l'implantation (Rappolee *et al.*, 1994). FGFR2 est le récepteur FGF exprimé le plus tôt dans le développement embryonnaire (Orr-Urtreger *et al.*, 1991). L'inhibition de la voie de signalisation des FGF bloque la division cellulaire dans la masse interne du blastocyste et le trophoblaste (Chai *et al.*, 1998). De plus, il a été

démontré que FGF4 promeut la prolifération des cellules souches trophoblastiques chez la souris, et empêche leur différenciation *in vitro* (Tanaka *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces évidences suggère que FGF4 induit la prolifération du trophoblaste en activant la voie FGF suite à sa liaison avec FGFR2. Il n'est cependant pas connu si la voie de signalisation FGF est activée lors de la sortie de l'embryon de la diapause chez les rongeurs, ni chez les carnivores.

2.4.5 La progranuline

La progranuline, aussi appelée le facteur de croissance dérivé des cellules PC (Zhou *et al.*, 1993), le précurseur épithélial (Plowman *et al.*, 1992), le précurseur granuline/épithéline (Zanocco-Marani *et al.*, 1999) ou l'acrogranine (Baba *et al.*, 1993a), est un facteur mitogénique qui peut promouvoir l'invasion et la tumorigénèse de l'épithélium (Zhou *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1998b; He and Bateman, 1999; Daniel *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002). La progranuline est un facteur de croissance sécrété de 68-88 kDa (Zhou *et al.*, 1993), possédant dans sa structure 7.5 répétitions d'une séquence consensus granuline/épithéline (Bhandari *et al.*, 1992). La séquence granuline/épithéline est un motif riche en cystéines, organisées en répétitions tandem (Bhandari *et al.*, 1992). Les domaines granuline/épithéline sont uniques, et par conséquent, la progranuline ne peut être classée dans aucune des familles de facteurs de croissance connues, même si une origine commune a été suggérée entre les granulines/épithélines et la famille de EGF/facteur de croissance de transformation- α (TGF α) (Hrabal *et al.*, 1996; Bateman and Bennett, 1998). Dans le génome humain, le gène codant pour la progranuline est situé sur le chromosome 17 et est

composé de 12 exons (Bhandari and Bateman, 1992). Chaque exon code pour un ou deux sous-domaines hemigranuline (Bhandari and Bateman, 1992; Baba *et al.*, 1993b). Exprimée virtuellement dans tous les tissus de l'organisme (Baba *et al.*, 1993b; Bhandari *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 2000), la progranuline est spécialement exprimée en hautes concentrations dans les cellules de type épithélial qui se répliquent rapidement comme les kératinocytes ou les entérocytes de la crypte profonde (Daniel *et al.*, 2000), et dans l'hypothalamus des rats nouveau-nés mâles (Uesaka *et al.*, 1995).

Ce facteur de croissance a également été associé à la néovascularisation et à la formation du tissu de granulation lors des processus inflammatoires liés à la guérison tissulaire (revu par (He and Bateman, 2003)), et affecte la progression des carcinomes adrenocorticaux (He *et al.*, 2002), des cancers de type glioblastome (Liau *et al.*, 2000), des carcinomes rénaux (Donald *et al.*, 2001), des cancers ovariens (Jones *et al.*, 2003) et de certaines lignées cellulaires tumorales du sein (Lu and Serrero, 2000). La progranuline peut activer les voies de signalisation intracellulaires Erk et PI3-K (Zanocco-Marani *et al.*, 1999; Lu and Serrero, 2000; He *et al.*, 2002), et causer une augmentation dans la cellule des cyclines D1 et B (Zanocco-Marani *et al.*, 1999; Lu and Serrero, 2000).

L'implication de la progranuline a aussi été mise en évidence dans le processus de la gastrulation, dans le développement de l'épiderme, du système nerveux, des vaisseaux sanguins ainsi que dans la spermatogénèse (Suzuki and Nishiahara, 2002; Daniel *et al.*, 2003).

L'expression de la progranuline est omniprésente durant les premières étapes du développement embryonnaire. Sa présence est retrouvée dans les ovocytes de la souris

(Diaz-Cueto *et al.*, 2000) et les spermatozoïdes du cochon d'inde, à partir desquels la progranuline a été purifiée pour la première fois (Anakwe and Gerton, 1990). Lorsque l'ovocyte est fécondé, les niveaux d'expression de l'ARNm de la progranuline diminuent graduellement jusqu'à l'embryon de stade 4 cellules, mais remontent ensuite à partir du stade 8 cellules, et sont abondants dans le trophoblaste des blastocystes avant l'implantation (Diaz-Cueto *et al.*, 2000). Une étude faite à l'aide de micropuces d'ADNc révèle que les transcrits de la progranuline sont encore plus élevés dans le blastocyste de stade post-adhésion, que de stade pré-adhésion (Qin *et al.*, 2003). La progranuline a pour effet de stimuler la prolifération des cellules du trophoblaste et de promouvoir l'expansion et l'éclosion du blastocyste (Diaz-Cueto *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2005). Suite à l'implantation chez la souris, la progranuline est exprimée dans le placenta, plus précisément dans les cellules déciduelles et les cellules géantes primaires (Daniel *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données suggère que la progranuline, parmi les nombreuses fonctions qu'elle exerce, est requise pour le développement du placenta. Sa fonction est probablement liée à l'implantation et à l'invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastes, mais le patron d'expression spatio-temporel in vivo de l'expression de la progranuline n'a été rapporté chez aucune espèce à présent.

2.4.6 Les prostaglandines

Les prostaglandines (PG) sont des composés bioactifs qui sont impliqués dans une variété de fonctions biologiques, et leur importance est due à leur nature vasoactive, mitogénique, ainsi qu'à leur capacité à induire la différenciation (Smith and Dewitt, 1996). Il n'est pas surprenant que ces composés soient également impliqués dans plusieurs

fonctions reproductives, incluant l'ovulation, l'implantation, la parturition et les changements cycliques de l'endomètre (Dey *et al.*, 2004).

L'acide arachidonique est la molécule à la base de la synthèse des prostaglandines. Retrouvée dans la membrane phospholipidique sous forme estérifiée (Irvine, 1982), l'acide arachidonique est rendue disponible pour la conversion lorsqu'elle est clivée par la phospholipase A₂ (PLA₂) (Dennis, 1994; Lopes *et al.*, 2007).

La conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (PGG₂, PGH₂) est une étape médiée par la cyclooxygénase (COX, ou PGH synthase) (Simmons *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2007). La PGH₂ est ensuite transformée en prostaglandines bioactives (PGI₂, PGD₂, PGE₂ ou PGF_{2α}), grâce à l'action de plusieurs PG synthases spécifiques (Wang and Dey, 2005)).

Il existe deux isoformes de COX, séparément codés par deux gènes. L'isoforme COX-1 est constitutif, tandis que l'isoforme COX-2 est induit sous l'influence de facteurs de croissance, de cytokines, ou de stimulations inflammatoires (Smith and Dewitt, 1996). Le rôle important de l'enzyme COX-2 dans l'implantation et la décidualisation a été démontré chez la souris dont le gène de *COX-2* a été invalidé (Dinchuk *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1997). La prostacycline (PGI₂) est fortement exprimée dans l'utérus au moment de la décidualisation chez la souris, et l'administration d'un analogue de la prostacycline rétablit partiellement le phénotype d'implantation et de décidualisation chez la souris déficiente en *COX-2*, ce qui démontre bien le rôle important des prostaglandines pour l'implantation (Lim *et al.*, 1999). En contrepartie, chez la souris dont le gène de *COX-1* a été inactivé, l'implantation et la décidualisation prennent place normalement, mais le traitement avec un

inhibiteur de COX-2 empêche ces événements d'avoir lieu, ce qui permet de constater que la présence de COX-2 compense la perte de COX-1 (Reese *et al.*, 1999).

L'analyse spatio-temporelle de l'expression de COX-2 supporte l'hypothèse que cette enzyme est requise pour l'implantation et la décidualisation. Chez la souris, l'expression de COX-2 est observée dans l'épithélium luminal et dans les cellules stromales, uniquement au site d'attachement de l'embryon (Chakraborty *et al.*, 1996). Chez les carnivores, l'expression de COX-2 a également été démontrée au moment critique de l'implantation. L'expression de l'enzyme COX-2 est induite dans l'épithélium utérin, dans les cellules stromales ainsi que dans les glandes au site d'implantation (Song *et al.*, 1998b). Chez la moufette tachetée (Das *et al.*, 1999), l'expression de COX-2 est induite dans l'utérus juste avant l'attachement de l'embryon, et reste présente jusqu'à 5 ou 6 jours après l'implantation.

Les prostaglandines sont aussi impliquées dans la formation du placenta, suivant l'implantation. L'enzyme PGE synthase est rapidement induite dans les cellules stromales suite à l'implantation chez le vison (Lopes *et al.*, 2006) et la souris (Ni *et al.*, 2002). De plus, les récepteurs transactivés par PGE₂ (EP) dans l'utérus, EP2 et EP4, sont impliqués dans la régulation du facteur de croissance endothelial vasculaire (VEGF) chez le vison (Lopes *et al.*, 2006). VEGF est connu comme étant un facteur de croissance qui soutient la prolifération des cellules endothéliales et l'augmentation de la perméabilité vasculaire pour l'établissement du réseau vasculaire placentaire (Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz *et al.*, 1989; Keck *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989; Matsumoto *et al.*, 2002). Chez le vison, VEGF et ses récepteurs sont exprimés par l'utérus et par le trophoblaste au moment de

l'implantation et de l'établissement du placenta (Winther and Dantzer, 2001; Lopes *et al.*, 2003).

L'action des prostaglandines est médiée par des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs lient à haute affinité une ou plusieurs prostaglandines (Narumiya *et al.*, 1999), et sont désignés comme IP, EP, DP et FP. Les prostaglandines peuvent également agir comme ligands des récepteurs nucléaires, ceux de la famille des PPAR.

2.4.7 Les récepteurs activés par les proliférateurs de péroxisomes (PPAR)

Au début des années 1990, les PPAR ont été identifiés comme des récepteurs nucléaires orphelins (Giguere, 1999), puis ont été associés aux ligands synthétiques de la classe des fibrates (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2005), et à la prolifération des péroxisomes chez les rongeurs (Isseman and Green, 1990). Les PPAR font partie intégrante de la superfamille des récepteurs nucléaires, comme les récepteurs d'hormones stéroïdiennes (SR), d'hormones thyroïdiennes (TR), de vitamine D (VDR), d'acide rétinoïque (RAR) et de rétinoïdes X (RXR) (Laudet *et al.*, 1992). Les PPAR sont aujourd'hui considérés comme étant des régulateurs critiques du métabolisme chez les mammifères (revue par Desvergne and Wahli, 1999). PPAR α a été le premier isotype de PPAR identifié chez la souris (Isseman and Green, 1990). Peu de temps après, deux autres isotypes ont été clonés chez *Xénopus* : PPAR β et γ (Dreyer *et al.*, 1992). Chez les mammifères, l'homologue de PPAR β est PPAR δ , vu les différences notables entre la structure des récepteurs des amphibiens et des mammifères (Desvergne and Wahli, 1999).

Chez les mammifères, PPAR α , δ et γ ont des patrons d'expression distincts, ainsi que des ligands et des gènes-cibles spécifiques. PPAR α (NR1C1) est exprimé dans les tissus démontrant un haut niveau de β -oxydation des acides gras comme le cœur, les reins, le foie, les intestins et le tissu adipeux brun, et est essentiel à la réponse hépatique aux fibrates, au métabolisme des acides gras et à la réponse inflammatoire (Giguere, 1999). PPAR δ (NR1C2) est exprimé de façon ubiquitaire et est associé au transport du cholestérol, à la cicatrisation (Fournier *et al.*, 2007) et à la réaction de décidualisation dans l'utérus chez les rongeurs (Lim *et al.*, 1999). PPAR γ (NR1C3) est abondant dans les tissus adipeux blancs et bruns mais est aussi présent dans d'autres tissus tels que l'épithélium mammaire, le colon et les macrophages. Cet isotype contrôle la différenciation des adipocytes ainsi que l'expression d'une vaste gamme de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique des lipides et du glucose (revues par Desvergne and Wahli, 1999; Giguere, 1999). PPAR γ est également impliqué dans plusieurs pathologies telles le diabète, le cancer et l'athérosclérose (revue par Desvergne and Wahli, 1999).

L'activation de PPAR par un ligand induit un changement de conformation du récepteur, qui peut alors s'hétérodimériser avec un récepteur de la famille des RXR (revue par Desvergne and Wahli, 1999). L'hétérodimère peut alors se lier à un élément de réponse *direct repeat-1* (DR-1) situé sur le promoteur des gènes-cibles, dont les séquences consensus AGGTCA sont séparées par 1 nucléotide (Kliewer *et al.*, 1992). Comme revu en détails par Desvergnes et Wahli (Desvergne and Wahli, 1999), en absence de ligands, l'hétérodimère PPAR-RXR se lie à des corépresseurs de récepteurs nucléaires, tels que le corepresseur de récepteur nucléaire (NCoR) ou le médiateur du silencement des récepteurs

de rétinoïdes et d'hormones thyroïdiennes (SMRT). Ces corépresseurs appartiennent à un complexe disposant une activité histone déacétylase (HDAC) qui empêche la décondensation de la chromatine pour la transcription (Figure 2.4). Lors de la liaison d'un ligand au récepteur, un changement de conformation est induit, ce qui déclenche le relâchement des complexes de corépresseurs liés à l'ADN et le recrutement de complexes de coactivateurs, composés de protéines telles que la protéine liant PPAR (PBP) (Yuan *et al.*, 1998), la protéine interagissant avec PPAR/protéine activatrice de récepteur 250 (PRIP/RAP250) (Zhu *et al.*, 2000), le coactivateur de PPAR γ - 1 (PGC1) (Puigserver *et al.*, 1999) ou le coactivateur de récepteurs stéroïdiens- 1 (SRC-1) (Xu *et al.*, 1998a) (Figure 2.4). Les complexes de coactivateurs interagissent avec d'autres cofacteurs comme la protéine liant CREB (CBP/p300) qui harborent une activité histone acétylase (HAT), favorisant la décondensation de la chromatine pour la rendre accessible aux complexes de transcription (Figure 2.4). La phosphorylation des sérines retrouvées dans la partie N-terminale des PPAR peut également moduler l'affinité du récepteur pour ses ligands, ce qui constitue une autre façon de moduler la transcription des gènes-cibles des PPAR (Desvergne and Wahli, 1999; Fournier *et al.*, 2007).

Les PPAR sont composés de 6 exons qui codent pour une protéine de 49-56 kDa, comportant 4 domaines caractéristiques de la famille des récepteurs nucléaires : le domaine A/B qui contient un site de transactivation indépendant des ligands (fonction d'activation - 1, ou AF-1), le domaine C (domaine de liaison à l'ADN) composé de deux doigts de zinc pour lier l'ADN et d'un site d'hétérodimérisation à RXR, le domaine D qui contient un site d'ancrage du cofacteur et un signal de localisation nucléaire, et le domaine E/F qui

comporte une grande poche hydrophobe pour l'interaction avec les ligands de nature lipidique (fonction d'activation -2, ou AF-2), un site de dimérisation et un site d'interaction avec les cofacteurs. Ce domaine E/F peut également interagir avec les protéines activées par le choc thermique (HSP), tel que démontré avec PPAR α et β/δ (Evans, 1988; Green and Chambon, 1988; Fournier *et al.*, 2007).

PPAR gamma a été bien étudié étant donné son rôle dans le diabète. Plusieurs ligands synthétiques de PPAR γ ont été développés pour le traitement de cette maladie. Trois isoformes de PPAR γ résultants de l'épissage alternatif et de l'utilisation différée du promoteur ont été identifiés jusqu'à maintenant: PPAR γ 1, 2 et 3. Deux protéines identiques sont produites suite à la traduction des transcrits 1 et 3 par deux promoteurs alternatifs (Fajas *et al.*, 1997). Quant au transcrit 2, il comporte un exon supplémentaire, ce qui résulte en une protéine de 30 acides aminés supplémentaires (Zhu *et al.*, 1995). Les isoformes PPAR γ 1 et 2 sont exprimés différenciellement selon les tissus. PPAR γ 1 est surtout retrouvé dans la rate, l'intestin et les tissus adipeux blancs, tandis que PPAR γ 2 est préférentiellement exprimé dans les tissus adipeux blancs et bruns (Giguere, 1999). Le patron d'expression et le rôle de l'isoforme 3 n'est pas bien connue pour l'instant (Fournier *et al.*, 2007).

Parmi les ligands de PPAR gamma on retrouve les ligands synthétiques de la famille des thiazolidinédiones (TZD), comprenant la troglitazone, la rosiglitazone (BRL49653) et la ciglitazone (Lehmann *et al.*, 1995). On retrouve également des ligands naturels, tels que la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J₂ (15-d-PGJ₂), un métabolite de la prostaglandine D₂ (Forman *et al.*, 1995), et des métabolites de l'acide linoléique, comme l'acide 9- et 13-

hydroxy-octadédienoïque (HODE), retrouvés dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydés (Nagy *et al.*, 1998).

Le rôle clé de PPAR γ dans le développement du placenta a été mis en évidence avec le modèle murin dans lequel le gène *de PPAR γ* a été inactivé (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999). Ces animaux ne survivent pas au-delà de 10 jours embryonnaires, et ceci a été attribué à un défaut du fonctionnement du placenta, étant donné que le conceptus dont le gène a été altéré se développe à terme lorsque le placenta est restitué par la formation de chimères tétraploïdes (Barak *et al.*, 1999). Les souris chez lesquelles *PPAR γ* est invalidé démontrent un phénotype où, les vaisseaux fœtaux ne pénètrent pas la couche de cytotrophoblaste, et les vaisseaux maternels sont dilatés et rompus, ce qui fait que les érythrocytes sont massivement phagocytés par les cellules du trophoblaste. Le syncytiotrophoblaste, pour sa part, ne se développe pas normalement à l'intérieur du labyrinthe. Un phénotype similaire est retrouvé chez les souris déficientes pour le gène de *RXR α* (Sapin *et al.*, 1997), ou pour les gènes de *RXR α* et *RXR β* simultanément (Wendling *et al.*, 1999), ce qui met en évidence que le développement du placenta dépend de l'intégrité de l'activité de l'hétérodimère PPAR γ -RXR α in vivo chez la souris.

L'expression de PPAR γ a été démontrée en premier lieu dans les cellules JEG-3 (choriocarcinome humain), par Matsuo et Strauss (Matsuo and Strauss, 1994). Dans le placenta murin, l'ARNm de *PPAR γ* est détecté à partir du jour embryonnaire 8,5, soit 4 jours après l'implantation, dans les régions du labyrinthe et du spongiotrophoblaste (Barak *et al.*, 1999). De façon similaire, dans le placenta du rat, les ARNm de *PPAR γ* et de *RXR α* sont présents à partir du jour embryonnaire 11 dans les mêmes régions (Wang *et al.*, 2002;

Asami-Miyagishi *et al.*, 2004). En contrepartie, PPAR γ est associé à toutes les étapes de la différenciation du trophoblaste dans le placenta humain. Durant les premiers stades de la gestation, son expression est retrouvée dans le cytotrophoblaste villositaire et extravillositaire. Durant le troisième trimestre de la gestation, l'expression apparaît dans le syncytiotrophoblaste, mais n'est plus présente dans le trophoblaste extravillositaire (Schaiff *et al.*, 2000; Schaiff *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2007).

La truie et la vache sont des animaux possédant un placenta de type épithéliochorial, c'est-à-dire non-invasif. Chez la truie, on retrouve l'expression de la protéine PPAR γ dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'endomètre cyclique ou gestant. Cependant, au site d'implantation du blastocyste au jour 25 de la gestation chez la truie, l'expression dans l'épithélium disparaît, alors qu'elle est induite dans le stroma subépithélial (Lord *et al.*, 2006). Le trophoblaste exprime également fortement PPAR γ (Lord *et al.*, 2006). Chez les bovins, une étude révèle que l'expression du transcrite de PPAR γ dans le trophoblaste est induite 2 jours avant l'implantation, et que les niveaux augmentent ensuite jusqu'au jour embryonnaire 17 (Cammass *et al.*, 2006). La présence de la protéine de PPAR γ chez les bovins a été signalée dans l'épithélium luminal et glandulaire, ainsi que dans le trophoblaste au moment de l'implantation (Cammass *et al.*, 2006).

L'expression de PPAR γ varie donc considérablement selon le type d'implantation et le degré d'invasion du trophoblaste dans l'endomètre. Le transcrite de PPAR γ est détecté spécifiquement au niveau embryonnaire, mais demeure absent dans l'endomètre chez les rongeurs et les humains qui possèdent un placenta haemochorial. Chez les espèces à placenta épithéliochorial par contre, la protéine PPAR γ est retrouvée autant au niveau de

l'épithélium luminal et glandulaire de l'endomètre qu'au niveau du trophoblaste. Une étude plus poussée de la diversité des patrons d'expression de PPAR γ dans différents types de placenta nous permettrait de mieux comprendre le rôle de PPAR γ dans l'implantation.

C'est principalement chez l'humain que l'influence de PPAR γ sur la différenciation des cellules du trophoblaste a été étudiée jusqu'à présent (revue par Fournier *et al.*, 2007). La troglitazone stimule la différenciation des cellules cytotrophoblastiques en syncytiotrophoblaste (Schaiff *et al.*, 2000), mais l'expression du transcrit de PPAR γ n'évolue pas durant la différenciation, ce qui indique que l'activation de PPAR γ n'influence pas de façon directe la différenciation des cellules du cytotrophoblaste (Tarrade *et al.*, 2001; Daoud *et al.*, 2005). L'activation de PPAR γ par la troglitazone induit la liaison du complexe PPAR γ -RXR α au promoteur du gène de l'hormone choriogonadotropine humaine (hCG), une hormone reconnue pour stimuler la différenciation du trophoblaste (Shi *et al.*, 1993; Cronier *et al.*, 1994; Tarrade *et al.*, 2001). L'activation de la transcription de l'hCG par PPAR γ serait donc un mécanisme possible d'induction de la différenciation des cellules du cytotrophoblaste. En plus d'influencer la différenciation du cytotrophoblaste, l'activation de PPAR γ induit également chez l'humain la transcription de l'hormone lactogène placentaire (HLP), de l'hormone de croissance placentaire (PGH) et de la leptine (Tarrade *et al.*, 2001).

Selon les travaux de Schaiff *et al.* (Schaiff *et al.*, 2005), l'activation de PPAR γ entraîne également un effet sur la quantité d'acide gras incorporée par les cellules de trophoblaste en culture. Comme observé dans d'autres types cellulaires (Martin *et al.*, 1997), une augmentation de l'expression de l'adipophiline (ADFP) et de la protéine de

transport des acides gras (FATP4), est évidente dans les cellules du cytotrophoblaste en culture après l'activation de PPAR γ par ses ligands (Schaiff *et al.*, 2005). PPAR γ serait également impliqué dans le contrôle de l'invasion des cellules du cytotrophoblaste extravilleux chez l'humain, étant donné que la présence d'agonistes de PPAR γ et de RXR α est associée à une diminution des capacités invasives de ces cellules. D'un autre côté, la présence d'un antagoniste permet d'augmenter le degré d'invasion des cellules du cytotrophoblaste extravilleux in vitro (Tarrade *et al.*, 2001). En plus de son rôle envisageable dans la différenciation des cellules du trophoblaste, PPAR γ a donc été impliqué dans la production d'hormones placentaires, dans l'apport des lipides aux cellules du cytotrophoblaste et dans le contrôle de l'invasion des cellules du cytotrophoblaste extravilleux chez l'humain.

Des études mettent en évidence que des ligands naturels pour PPAR γ sont présents durant la période de l'établissement du placenta chez l'humain et les rongeurs. Par exemple, le sérum de femmes enceintes active l'expression de PPAR γ dans les cellules JEG-3 (Waite *et al.*, 2000). Certains lipides oxydés dont l'acide 9S-hydroxy-10E, 12S-octadécadiénoïque (9-HODE), l'acide 13S-hydroxy-9Z, 11E-octadécadiénoïque (13-HODE) et l'acide 15S-hydroxy-5Z, 11Z, 13E-eicosatétranoïque (15-HETE) sont de plus capables d'activer PPAR γ dans les cellules du cytotrophoblaste villeux chez l'humain, et de stimuler la production d'hCG (Schild *et al.*, 2002). D'autre part, l'identification de la présence du métabolite 15-d-PGJ $_2$ dans les cellules du syncytiotrophoblaste chez le rat par immunofluorescence à partir du jour 13 de la gestation suggère que ce ligand de PPAR γ est produit de façon endogène au site d'implantation (Asami-Miyagishi *et al.*, 2004).

2.4.8 Les facteurs d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion jouent un rôle important dans l'implantation, et surtout dans l'attachement du trophoblaste (revues par Kimber and Spanswick, 2000; Dey *et al.*, 2004). Elles médient les interactions d'adhésion entre les cellules, ou entre cellules et matrice extracellulaire. Suite à la liaison d'une molécule d'adhésion avec son récepteur, des voies de signalisation intracellulaires sont activées (revue par Giancotti and Ruoslahti, 1999). Parmi les facteurs d'adhésion cellulaire dont le rôle a été reconnu dans l'implantation, on retrouve les sélectines, les galectines, les intégrines, les cadhérines et les mucines (revue par Dey *et al.*, 2004).

Muc1 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire associée à la membrane cellulaire, membre de la famille des mucines (Hollingsworth and Swanson, 2004). Au niveau du placenta chez la souris, Muc1 est exprimé à la surface apicale des cellules épithéliales situées à l'interface foeto-maternelle (Shalom-Barak *et al.*, 2004). Les souris déficientes en Muc1 démontrent une dilatation des sinus sanguins maternels, phénomène qui, de façon similaire, est observé chez les souris déficiente en *PPAR γ* (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999; Shalom-Barak *et al.*, 2004). Il a également été démontré que *PPAR γ* peut réguler directement la transcription du gène *Muc1* en s'associant à son promoteur dans les cellules trophoblastiques différenciées *in vitro* chez la souris (Shalom-Barak *et al.*, 2004). Ceci indique donc que l'action de Muc1 est essentielle pour l'établissement du placenta, et que sa transcription est dirigée en tout ou en partie par *PPAR γ* .

Les intégrines jouent un rôle important en reproduction et influencent plusieurs événements comme la fécondation, l'implantation et le développement du placenta (Bowen and Hunt, 2000). L'adhésion du trophoblaste à la matrice extracellulaire durant l'implantation et la formation du placenta semble être médiée principalement par les intégrines (Wang and Armant, 2002; Sutherland, 2003). Les intégrines sont des glycoprotéines réceptrices transmembranaires, constituées d'une sous-unité alpha (α) et une sous-unité bêta (β). Chaque intégrine possède un large domaine extracellulaire permettant généralement la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et la laminine, un segment transmembranaire, et un domaine cytoplasmique très court et dépourvu d'activité enzymatique (revues par Schwartz *et al.*, 1995; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Lorsqu'activées par leurs ligands, les intégrines s'agrègent ensemble et forment des sites d'adhésion focaux qui interagissent avec des protéines adaptatrices, qui se lient à leur tour à des protéines du cytosquelette ou de signalisation intracellulaire (revues par Giancotti and Ruoslahti, 1999; Hynes, 2002).

Plusieurs intégrines montrent une expression différentielle dans l'endomètre durant la fenêtre d'implantation, incluant $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 1$ (Dey *et al.*, 2004). Du côté de l'embryon, les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 3$ et $\alpha v\beta 3$ sont présentes pendant la période d'implantation et après l'implantation dans le trophoblaste (Sutherland *et al.*, 1993). Ces récepteurs embryonnaires sont capables de lier la fibronectine in vitro (Schultz and Armant, 1995). La fibronectine, lorsque liée à $\alpha 5\beta 1$ ou $\alpha v\beta 3$, initie une voie de signalisation intracellulaire, ce qui a pour effet de mobiliser le calcium intracellulaire et d'induire le

transport des vésicules cytoplasmiques, pour renforcer l'adhésion des intégrines à la fibronectine (Armant *et al.*, 2000; Wang and Armant, 2002; Armant, 2005).

L'intégrine $\alpha v \beta 3$ est exprimée à la surface apicale des cellules du trophoblaste du blastocyste et au niveau des contacts focaux situés sur les prolongations du trophoblaste *in vitro* (Kimber, 2000; Kimber and Spanswick, 2000). Ce récepteur interagit avec la fibronectine, mais aussi avec la vitronectine, la tenascine, l'ostéopontine et la thrombospondine (Kimber, 2000; Kimber and Spanswick, 2000). Le blocage de l'activité de $\alpha v \beta 3$ avec des anticorps spécifiques cause une réduction du nombre de sites d'implantation observés chez la souris et le lapin (Illera *et al.*, 2000).

Par opposition à $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ est exprimé au niveau de la surface interne du blastocyste avant l'implantation (Sutherland *et al.*, 1993). Dans les cellules du trophoblaste en culture, $\alpha 5 \beta 1$ est transloqué à la partie apicale des cellules du trophoblaste et se lie à la fibronectine lors de la différenciation (Schultz *et al.*, 1997). De plus, sous conditions *in vitro*, $\alpha 5 \beta 1$ semble être requis pour initier la formation de prolongations du trophoblaste (Rout *et al.*, 2004).

La distribution des intégrines durant l'invasion de l'endomètre murin par le trophoblaste est régulée de façon chronologique. Les intégrines $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha v \beta 5$ et $\alpha v \beta 6$ sont exprimées dans le cytotrophoblaste des villosités pour limiter leur migration (Zhou *et al.*, 1998; Bowen and Hunt, 2000). L'expression de ces intégrines diminue lorsque le trophoblaste se différencie et devient invasif, pendant que l'expression des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$ augmente (Damsky *et al.*, 1993). Alors que l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ semble plutôt être associée à l'atténuation de l'invasion, l'intégrine $\alpha v \beta 3$ semble être au contraire associée à

la promotion de l'invasion de l'endomètre par le syncytiotrophoblaste (Damsky *et al.*, 1994; Bowen and Hunt, 2000).

Comme mentionné plus tôt, l'intégrine $\alpha\beta3$ est un récepteur pour l'ostéopontine (OPN), une glycophosphoprotéine sécrétée de 70 kDa, identifiée à l'origine comme une protéine de la matrice osseuse (Franzen and Heinegard, 1985; Fisher *et al.*, 1987; Prince *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1990). OPN appartient à un regroupement de 5 gènes de la famille des SIBLING (Small integrin- binding ligand N-linked glycoprotein), réunis sur le chromosome 4 humain (Lessey, 1994).

La molécule d'ostéopontine est un monomère dont la taille varie de 25 à 75 kDa, qui peut subir des changements posttranscriptionnels considérables, à savoir la glycosylation, la phosphorylation et le clivage (Johnson *et al.*, 2003). De nombreux effets d'OPN ont été catalogués, incluant l'adhésion entre cellules, l'amélioration des communications entre cellules et matrice extra-cellulaire et la promotion de la migration des cellules immunitaires et tumorales (Johnson *et al.*, 2003). Mis à part $\alpha\beta3$, d'autres récepteurs interagissent avec OPN, soit $\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$ et $\alpha8\beta1$ (Hu *et al.*, 1995; Denda *et al.*, 1998).

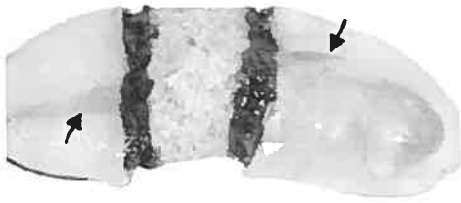
Plusieurs évidences suggèrent qu'OPN joue un rôle important dans l'implantation et lors de l'attachement des cellules du trophoblaste à l'épithélium utérin. Dans l'utérus humain, OPN est présent dans l'endomètre lors de la phase sécrétoire au niveau de la décidua, ce qui suggère qu'OPN joue un rôle au moment de l'implantation (Young *et al.*, 1990; Denhardt and Guo, 1993). Le conceptus n'exprime pas l'ARNm d'OPN chez certaines espèces, dont le mouton et le porc. Chez le mouton cependant, la protéine se

trouve fortement exprimée à la surface du trophoblaste, probablement dû à la liaison d'OPN maternel aux récepteurs intégrines du trophoblaste (revue par Johnson *et al.*, 2003). Chez la souris, l'embryon exprime OPN à partir d'un stade embryonnaire précoce, et cette expression diminue au jour embryonnaire 5.5, soit un jour après l'implantation (Bjorkman, 1973). Ces données suggèrent donc qu'OPN est probablement impliqué au niveau de l'attachement du trophoblaste à l'épithélium utérin.

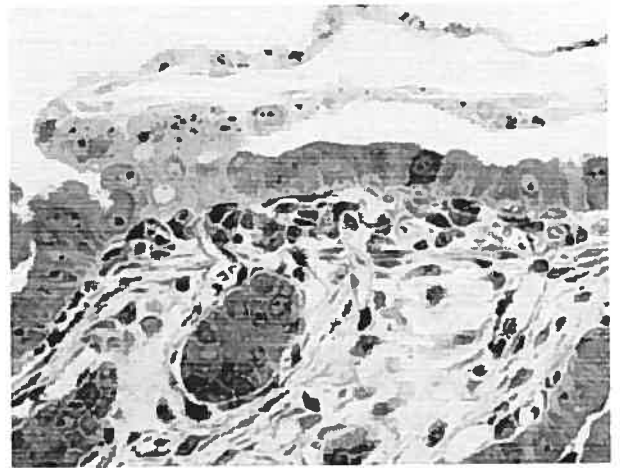
Chez l'humain, OPN est surtout exprimé par le cytotrophoblaste invasif extravilloux (Daiter *et al.*, 1996). Dans des études *in vitro*, l'expression d'OPN est induite lors de la fusion des cellules du cytotrophoblaste (Omigbodun *et al.*, 1997). L'expression d'OPN dans le placenta humain semble être régulée par la progestérone, et les travaux de Omigbodun *et al.* (Omigbodun *et al.*, 1997) suggèrent que la progestérone sécrétée par le syncytiotrophoblaste est responsable de l'augmentation de l'expression d'OPN par le cytotrophoblaste non différencié, afin d'augmenter l'adhésion cellulaire et initier des cascades de signalisation intracellulaire. Chez les espèces carnivores cependant, on ne sait pas quels rôles jouent les intégrines et l'OPN durant l'implantation et la formation du placenta.

Comme discuté dans cette section, plusieurs gènes doivent interagir de façon extrêmement complexe pour que l'implantation soit un succès, et nous en avons mentionné que quelques uns. L'étude de l'implantation amène une nouvelle approche pour l'étude de ces gènes. Ces nouvelles découvertes mènent inévitablement à de nouveaux questionnements. Le rôle de quelques uns de ces gènes sera étudié plus en profondeur dans les prochaines sections de cet ouvrage.

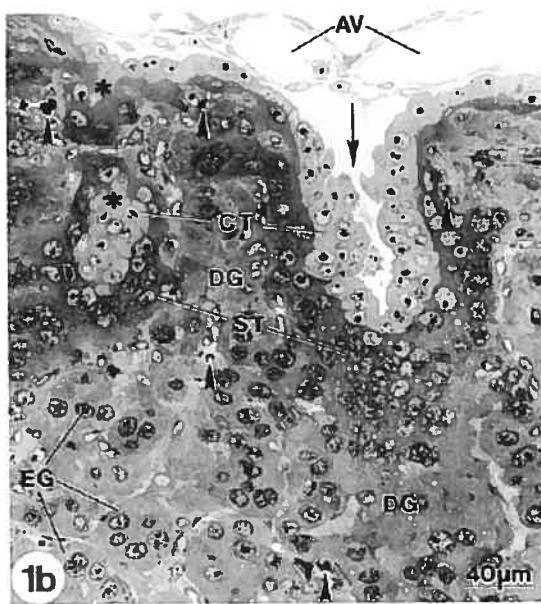
a)



b)



c)



d)

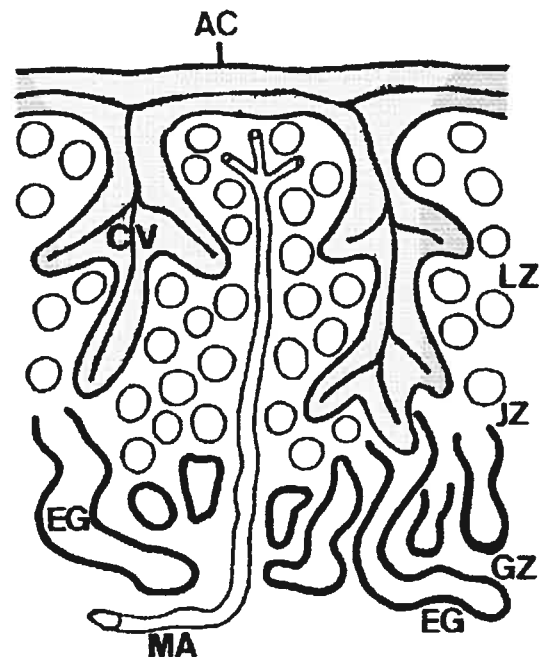


Figure 2.1 Le placenta des espèces carnivores. **a)** Le placenta zonaire typique des espèces carnivores est constitué d'une bande ceinturant le sac chorionique. Ici est représenté le placenta zonaire complet du chien. Les deux bandes vertes représentent les effusions sanguines marginales (figure tirée de Miglino *et al.*, 2006). **b)** L'implantation par déplacement épithélial. Cette photomicrographie représente une plaque syncytiotrophoblastique pénétrant entre les cellules épithéliales de l'endomètre chez la mouffette tachetée (figure tirée de Enders and Mead, 1996). **c)** La formation des villosités chorioniques chez le vison. Sur la photomicrographie, on distingue le cytotrophoblaste (CT) et le syncytiotrophoblaste (ST) qui forment les villosités chorioniques (flèche et *), qui progressent à l'intérieur de l'endomètre. Les masses symplasmiques apparaissent, elles sont composées entre autres de glandes en dégénérescence (DG) (figure tirée de Pfarrer *et al.*, 1999). **d)** Schéma du placenta de vison comprenant la zone allantochorionique (AC), la zone du labyrinthe (LZ), comprenant les villosités chorioniques (CV) et les vaisseaux maternels (MA), la zone de jonction (JZ) et la zone glandulaire ou basale (GZ), constituée des glandes endométriales intactes (EG) (figure tirée de Pfarrer *et al.*, 1999).

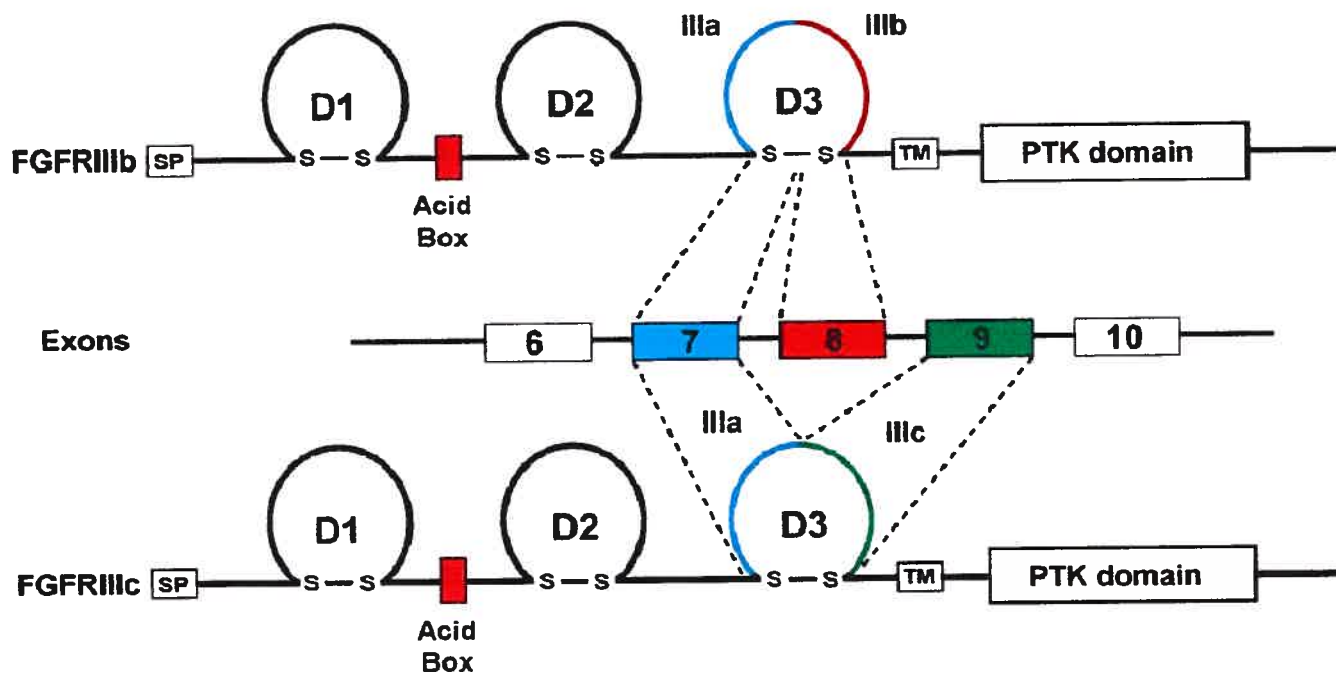


Figure 2.2 Il existe différents isoformes du récepteur FGFR2, générés par épissage alternatif du domaine *Ig-like* D3 (III). L'exon 7(a) code pour la partie N-terminale du domaine, et les exons 8(b) et 9(c) codent de façon alternative pour la partie C-terminale. Les isoformes resultants sont FGFR2 IIIb et FGFR2 IIIc. FGFR2 IIIc est entre autres un récepteur pour FGF4 (figure tirée de Eswarakumar *et al.*, 2005).

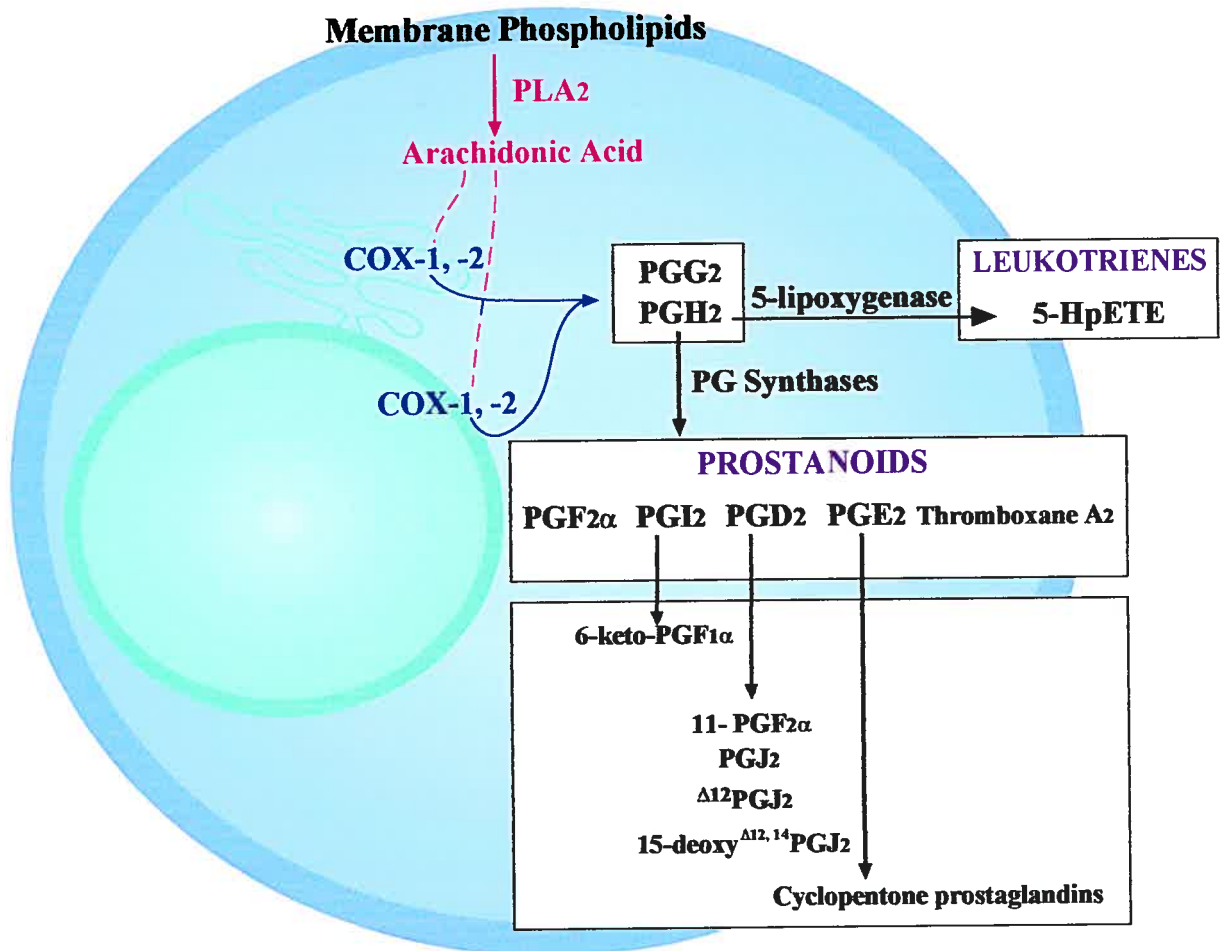
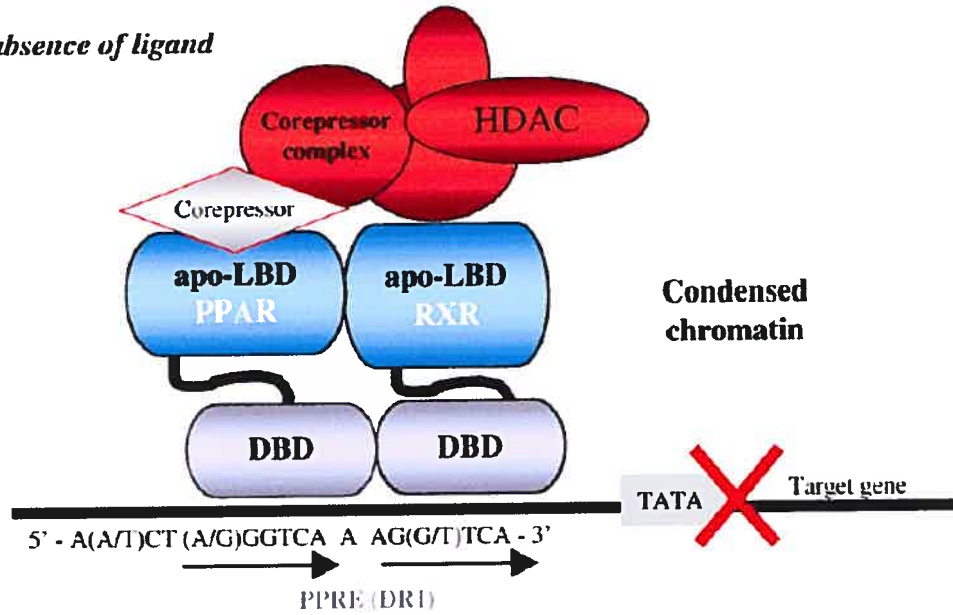
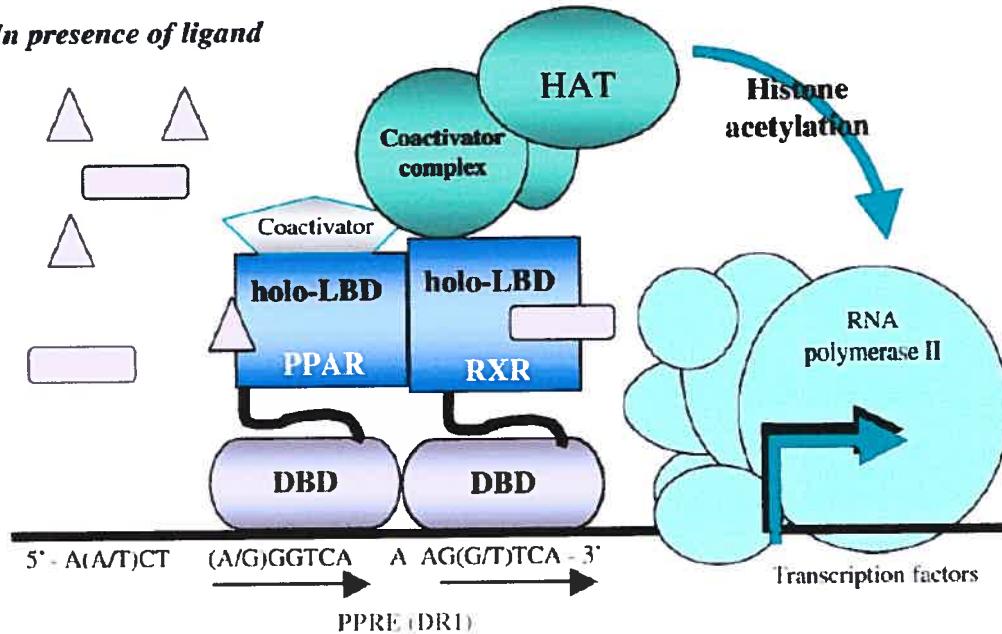


Figure 2.3 La synthèse des prostaglandines. Le substrat pour la synthèse des prostaglandines est l'acide arachidonique, dérivée des phospholipides membranaires. L'enzyme limitante à la synthèse des prostaglandines est la cyclooxygénase-2, qui joue un rôle important lors de l'implantation (figure tirée de Lopes *et al.*, 2007).

In absence of ligand



In presence of ligand



△ PPAR ligand

□ RXR ligand

Figure 2.4 Le mode d'action des récepteurs nucléaires. Le panneau du haut représente le recrutement de corepresseurs par le complexe PPAR-RXR en absence de ligands, et le recrutement d'un complexe HDAC qui favorise la condensation de la chromatine et la répression de la transcription du gène-cible. Le panneau du bas représente le recrutement de cofacteurs par l'hétérodimère PPAR-RXR en présence de ligands. Les cofacteurs aideront au recrutement d'un complexe HAT qui favorise la décondensation de la chromatine, et d'un complexe d'ARN polymérase II qui amorce la transcription du gène-cible (figure tirée de Fournier *et al.*, 2007)

3.0 ARTICLE PREMIER

The escape of the mink embryo from obligate diapause

Joëlle A. Desmarais¹, Vilceu Bordignon², Flavia L. Lopes¹, Lawrence C. Smith¹

and Bruce D. Murphy¹

¹Centre de recherche en reproduction animale. Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, QC Canada J2S 7C6; ²Department of

Animal Science, McGill University, Macdonald Campus, 21,111 Lakeshore,

Ste-Anne-de-Bellevue, QC Canada H9X 3V9.

Key words: Diapause, embryo, trophoblast, inner cell mass

This investigation was supported by Discovery Grant # 137013-98 from the Natural Sciences and Engineering Research Council to BDM.

Address correspondence to: Dr. B.D. Murphy, CRRA, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, QC

J2S 7C6, electronic mail

Facsimile: 450 778 8103

The Escape of the Mink Embryo from Obligate Diapause¹

Joëlle A. Desmarais,² Vilceu Bordignon,² Flavia L. Lopes,¹ Lawrence C. Smith,¹ and Bruce D. Murphy^{2,1}

Centre de recherche en reproduction animale,¹ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Department of Animal Science,² McGill University, Macdonald Campus, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada H9X 3V9

ABSTRACT

The obligate embryonic diapause that characterizes gestation in mink engenders a developmental arrest at the blastocyst stage. The characteristics of escape from obligate diapause were investigated in embryos reactivated by treatment of the dams with exogenous prolactin. Protein and DNA synthesis showed marked increases within 72 h after the reinitiation of development, and embryo diameter increased thereafter. Trophoblast cells from embryos at Day 5 after activation proliferated more readily *in vitro* than trophoblasts from diapause or from Day 9 after activation, while in Day 9 embryos, cells from the inner cell mass (ICM) replicated comparatively more readily *in vitro*. There was evidence of expression of fibroblast growth factor-4 (FGF4) in both diapause and activated embryos and in ICM, but not the trophoblast. FGF receptor-2 was present in embryos from Day 5 after reactivation in both trophoblast and ICM cell lines. Trophoblast cell lines established from mink embryos proliferated in culture in the presence of FGF4 with a doubling time of 1.4 days, while in its absence, the doubling time was 4.0 days. We conclude that, during reinitiation of embryogenesis in the mink after diapause, embryo growth is characterized by gradual increases in protein synthesis, accompanied by mitosis of the trophoblast and ICM. There appears to be a pattern of differential proliferation between cells derived from these embryonic compartments, with the trophoblast phase of replication occurring mainly in the early reactivation phase, while the ICM proliferates more rapidly nearer to the time of implantation.

early development, embryo, implantation, trophoblast

INTRODUCTION

Obligate embryonic diapause is a developmental arrest that occurs after the formation of a blastocyst of 250–500 cells [1]. It characterizes the gestation of a number of species of ursid and mustelid carnivores [2]. Obligate diapause serves as a mechanism to coordinate parturition to the most favorable time for neonatal survival, usually in early May in the Northern Hemisphere. Thus, the photoperiod associated with the vernal equinox is an important determinant for reinitiation of embryo development [3]. In the mink, it has been definitively shown that hypophysial prolactin is the proximal trigger that initiates the progression of the

ovarian, embryonic, and uterine events that terminate diapause and result in implantation [4–6]. From fertilization through implantation, the mustelid embryo remains encapsulated in the acellular glycoprotein zona pellucida of the oocyte [1]. Early investigations of the mink embryo indicated that embryo growth, fluid uptake, and cell replication were absent during diapause [7, 8]. In contrast, embryos in the ferret, a mustelid lacking embryonic diapause, undergo incremental enlargement from the time of blastocyst formation on Day 6 after ovulation to nidation on Day 12 [9–10]. Exponential increases in both the inner cell mass (ICM) and trophoblast cell numbers of the ferret embryo have been observed during the preimplantation period [11].

The proximal stimulus that induces the development of the trophoblast and the ICM of the mink embryo is only partially known. It has been shown that fibroblast growth factor-4 (FGF4) is necessary for proliferation of the mouse trophoblast *in vitro* [12]. In the mouse, FGF4 is expressed by the zygotic genome, beginning at embryo cleavage; expression persists through preimplantation development [13] and is required for postimplantation proliferation of both ICM and trophoblast [14]. Of the known FGF receptors (FGFRs), FGFR2 expression appears to be the earliest expressed during embryonic development in the mouse [15] and its absence compromises peri- and postimplantation proliferation of both trophoblast and ICM [16].

Mink blastocysts in diapause can survive in coculture with mink uterine cell lines and a low frequency of escape from diapause has been shown to occur under these conditions [17]. Little is known about the cellular events that characterize the reinitiation of embryonic development in mink. In this investigation, the paradigm of prolactin treatment *in vivo* was employed to terminate diapause. Embryo expansion, protein synthetic capability, and the proliferative capacity of the trophoblast and ICM were then characterized, as was the expression of FGF4 and FGFR2 by embryos and embryo-derived cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Treatments

All procedures with live animals were approved by the Comité de déontologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Investigations were carried out over four successive annual breeding seasons using ranch mink of the Dark and Pastel varieties purchased from A. Richard (St. Damase, QC, Canada). Females were bred to two fertile males according to usual commercial farming procedures. Prior to 21 March and 7–9 days after the final mating, embryos in diapause were collected from the first group (0-time) of animals. The remaining animals were mated with 1 mg kg⁻¹ day⁻¹ ovine prolactin (Sigma, Oakville, ON, Canada) to terminate preimplantation delay. Embryos were collected by repeated flushing of the uterine horns with TC-199 medium (Gibco, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (Gibco) from a minimum of 3 and a maximum of 22 animals per collection date, at 1–2-day intervals.

¹Supported by Discovery Grant 137014-96 from the Natural Sciences and Engineering Research Council to B.D.M.

²Correspondence: B.D. Murphy, C.R.A. 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, QC, Canada J2S 7C6; FAX 450-776-6161.

Received: 7 April 2003

First decision: 27 April 2003

Accepted: 16 October 2003

© 2004 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
ISSN: 0006-7163; http://www.biolreprod.org

3.1 ABSTRACT

The obligate embryonic diapause that characterizes gestation in mink engenders a developmental arrest at the blastocyst stage. The characteristics of escape from obligate diapause were investigated in embryos reactivated by treatment of the dams with exogenous prolactin. Protein and DNA synthesis showed marked increases within 72 h after the reinitiation of development, and embryo diameter increased thereafter. Trophoblast cells from embryos at Day 5 after activation proliferated more readily in vitro than trophoblasts from diapause or from Day 9 after activation, while in Day 9 embryos, cells from the inner cell mass (ICM) replicated comparatively more readily in vitro. There was evidence of expression of fibroblast growth factor-4 (FGF4) in both diapause and activated embryos and in ICM, but not the trophoblast. FGF receptor-2 was present in embryos from Day 5 after reactivation in both trophoblast and ICM cell lines. Trophoblast cell lines established from mink embryos proliferated in culture in the presence of FGF4 with a doubling time of 1.4 days, while in its absence, the doubling time was 4.0 days. We conclude that, during reinitiation of embryogenesis in the mink after diapause, embryo growth is characterized by gradual increases in protein synthesis, accompanied by mitosis of the trophoblast and ICM. There appears to be a pattern of differential proliferation between cells derived from these embryonic compartments, with the trophoblast phase of replication occurring mainly in the early reactivation phase, while the ICM proliferates more rapidly nearer to the time of implantation.

3.2 INTRODUCTION

Obligate embryonic diapause is a developmental arrest that occurs after the formation of a blastocyst of 250-500 cells [1]. It characterizes the gestation of a number of species of ursid and mustelid carnivores [2]. Obligate diapause serves as a mechanism to coordinate parturition to the most favorable time for neonatal survival, usually in early May in the Northern Hemisphere. Thus, the photoperiod associated with the vernal equinox is an important determinant for reinitiation of embryo development [3]. In the mink, it has been definitively shown that hypophysial prolactin is the proximal trigger that initiates the progression of the ovarian, embryonic and uterine events that terminate diapause and result in implantation [4-6]. From fertilization through implantation, the mustelid embryo remains encapsulated in the acellular glycoprotein zona pellucida of the oocyte [1]. Early investigations of the mink embryo indicated that embryo growth, fluid uptake and cell replication were absent during diapause [7, 8]. In contrast, embryos in the ferret, a mustelid lacking embryonic diapause, undergo incremental enlargement from the time of blastocyst formation on Day 6 after ovulation to nidation on Day 12 [9, 10]. Exponential increases in the both inner cell mass (ICM) and trophoblast cell numbers of the ferret embryo have been observed during the preimplantation period [11].

The proximal stimulus that induces the development of the trophoblast and the ICM of the mink embryo is only partially known. It has been shown that fibroblast growth factor-4 (FGF4) is necessary for proliferation of the mouse trophoblast in vitro [12]. In the mouse, FGF4 is expressed by the zygotic genome, beginning at embryo cleavage; expression persists through preimplantation development [13], and is required for

postimplantation proliferation of both ICM and trophoblast [14]. Of the known FGF receptors (FGFRs), FGFR2 expression appears to be the earliest expressed during embryonic development in the mouse [15] and its absence compromises peri- and postimplantation proliferation of both trophoblast and ICM [16].

Mink blastocysts in diapause can survive in coculture with mink uterine cell lines and a low frequency of escape from diapause has been shown to occur under these conditions [17]. Little is known about the cellular events that characterize the reinitiation of embryonic development in mink. In this investigation, the paradigm of prolactin treatment in vivo was employed to terminate diapause. Embryo expansion, protein synthetic capability, and the proliferative capacity of the trophoblast and ICM were then characterized, as was the expression of FGF4 and FGFR2 by embryos and embryo-derived cell lines.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Animals and Treatments

All procedures with live animals were approved by the Comité de déontologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Investigations were carried out over four successive annual breeding seasons using ranch mink of the Dark and Pastel varieties purchased from A. Richard (St. Damase, QC, Canada). Females were bred to two fertile males according to usual commercial farming procedures. Prior to 21 March and 7 to 9 days after the final mating, embryos in diapause were collected from the first group (0-time) of animals. The remaining animals were injected with $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ovine prolactin

(Sigma, Oakville ON, Canada) to terminate preimplantation delay. Embryos were collected by repeated flushing of the uterine horns with TC-199 medium (Gibco, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (Gibco) from a minimum of 3 and a maximum of 22 animals per collection date, at 1-2 day intervals over 11 days after the initiation of treatment. Groups of embryos were pooled within each day of collection, and the number of embryos per day ranged from 34 to 56, except for Day 1, when the sample comprised 10 embryos collected from three different uteri. Embryo diameters were estimated by ocular micrometer.

3.3.2 DNA and Protein Synthesis

To determine the pattern of acquisition of mitotic capability, embryos were collected in diapause and at Days 3, 5, 9, 11 and 13 after initiation of activation by prolactin (PRL) treatment. They were incubated overnight in the presence of 100 μ M bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdU, Sigma) to determine DNA synthesis through embryo reactivation, as previously described [18] with minor modification. Following incubation, embryos were liberated from the zona/capsule by treatment with a solution of 0.1 % pronase (Sigma), then fixed in 10% formalin for 10 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Biopharm, Laval, PQ, Canada) in phosphate buffered saline (PBS, Gibco) for 3 h, and washed twice in blocking solution (PBS, 3% BSA, 0.1% Tween 20, BioRad, Richmond CA) for 20 min at room temperature. Embryos were incubated for 2 h in 10 μ l of anti-BrdU monoclonal antibody (Amersham, Oakville, ON, Canada) containing 1 μ g/ml DNase, washed in blocking solution, and incubated with fluorescein-labeled goat anti-mouse IgG (Sigma) at 1:100 dilution. Embryos were then washed again in blocking

solution and mounted onto slides in Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 5 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma) to visualize nuclei.

To estimate protein synthesis, newly flushed embryos were incubated in TC-199 medium in the presence of ^{35}S -L-methionine (New England Nuclear, Guelph, ON, Canada) at a concentration of 10 mCi/ ml at 37°C for 2 h. They were then washed twice for 10 min in Tris-buffered saline, pH 7.6 (20 mM Tris, 137 mM NaCl and 1M HCl). Embryos were lysed in SDS cold dissociation buffer and ^{35}S -methionine incorporation was determined as described by Bell et al.[19].

3.3.3 Culture of Trophoblast and ICM-derived Cells.

To determine the growth potential of the trophoblast and ICM, embryos from the pool collected during diapause (n=3), at Day 5 (n=5) and Day 9 (n=5) after initiation of activation were employed. ICM and trophoblast tissues were visualized by microscopy and manually dissected. Cell populations were plated onto a mouse fetal fibroblast feeder monolayer. The entire ICM was cultured in mouse embryonic stem (ES)-cell medium [20], while segments of trophoblast were incubated in trophoblast stem (TS)-cell medium containing 25 µg/ml FGF4 (Sigma) as described by Tanaka et al. [12]. The medium was changed at 2- to 3-day intervals, and the capacity of ICM and trophoblast explants to proliferate was determined by daily inspection of the colonies over 7 days. In cultures that proliferated, cells were passaged at confluence by scalpel or by trypsinization (0.25% trypsin EDTA supplemented with 10% chicken serum; Gibco). The trophoblast monolayers developed vesicular outgrowths (Fig. 1); these were removed by pipetting and

were plated into gelatin-coated wells, with fibroblast-conditioned TS-cell medium to replace the fibroblast monolayer.

To estimate the rate of growth of the trophoblast cell populations and their dependence on FGF4 for proliferation [12], cells were incubated in medium with or without FGF4 supplementation. Growth was assessed first by determining the maximum diameter of the consequent colonies, measured by ocular micrometer at 6, 24 or 48 h after plating. The growth curves were determined for trophoblast cells over 7 days in culture in fibroblast-conditioned medium in the presence or absence of FGF4. Cultures were terminated and cells were fixed with cold methanol and stored at -20°C until staining and counting. Cells were then washed for 5 min with ice-cold PBS, incubated in the dark for 5 min with 100 ng/ml 4'-6-diaminino-2-phenylindol (DAPI; Sigma), and again washed for 5 min with PBS. Ten pre-assigned fields of each culture well were photographed under epifluorescence at 100 X and all nuclei were enumerated.

Cells from both ICM and trophoblast cultures were frozen on liquid N₂ and preserved for periods of several weeks before thawing and reconstituting of cultures.

3.3.4 RNA Isolation

Blastocysts recovered by uterine flushing were washed in PBS and frozen in separate tubes in liquid nitrogen. Total RNA was extracted with RNeasy Protect Mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), with modifications to the standard protocol. Briefly, embryonic cells were disrupted with 350 μl of RLT buffer + β -mercaptoethanol, followed by a 20-sec vortex and the addition of 350 μl 70 % ethanol. The column was washed once

with 400 µl RW1 buffer, and a second time with 400 µl RPE buffer. RNA was eluted with 22 µl dimethyl pyrocarbonate-treated water for 10 min. From this volume, 8.8 µl was used for reverse transcription of mRNA.

RNA isolation from the trophoblast, ICM cells and the cells of the fibroblast feeder layer was achieved according to the standard procedures with Qiaquick RNA isolation kit (Qiagen). An aliquot of 1 µg of the total RNA was used to reverse transcription.

3.3.5 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Isolated RNA was treated with DNase 1 RNase free (Ambion, Austin, TX), and reverse transcribed into cDNA with Superscript RNase H⁻ enzyme (Invitrogen, Carlsbad CA) according to manufacturer instructions. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed on a thermal cycler (MJ Research, Scarborough, ON, Canada) with 1U of Taq DNA polymerase (Amersham) per µl of reaction in a final volume of 20 µl. One microliter of the reverse transcription product was used for each PCR for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and FGFR2; 2.0 µl reverse transcription product + 10% Q solution (Qiagen) were required to detect FGF4 in each PCR. The FGFR2 primer sequences were designed with the Oligo 4.0 program (National Biosciences Inc., Plymouth, MN) and based on an homology among *Canis familiaris* (Genebank accession number AF211257), *Homo sapiens* (Z71929), *Mus musculus* (NM_010207) and *Oryctolagus cuniculus* (AF184968). FGFR2 sense: 5'- GGA CAG TGC TTA TTG GGG AGT AC – 3' reverse: 3'- GCG ATG CTC CTG CTT AAA CTC CT- 5'. FGF4 primers were bovine specific [21]. GAPDH primers were designed from the mink GAPDH mRNA partial

sequence (GeneBank accession number AF076283), GAPDH sense: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG- 3', reverse 3'-GTC CAT GCC ATC ACT GCC AC- 5'.

3.3.6 Data Analyses

Data were analysed by means of least-square analysis of variance in the General Linear Model procedures of SAS (SAS Institute, Cary, NC). Following confirmation of a significant F value, comparisons among means were made by the Tukey honestly significant difference test. Regression analysis was performed for in vitro proliferation experiments. Significance was established at $P < 0.05$.

3.4 RESULTS

3.4.1 Evolution of Embryo Size During Reactivation

Embryos in diapause displayed a consistent diameter approximating 0.23 mm (Fig. 2). This parameter was constant through Day 3 after treatment with prolactin followed by a progression of embryo expansion to maxima on Day 13 following initiation treatment. The largest embryos recovered were 2.0 mm in diameter. In approximately half of the animals examined at Day 13, there were implantation chambers in the uterus and evidence of implantation in the form of proliferation of trophoblastic knobs and trophoblast invasion into the endometrial epithelium (Fig. 3).

3.4.2 Embryo DNA and Protein Synthesis

BrdU incorporation was measured to determine DNA synthesis throughout embryo reactivation. No uptake of BrdU could be detected in embryos in diapause, suggesting that DNA synthesis was not underway. By Day 3 after initiation of prolactin treatment, there was substantial BrdU incorporation into embryonic cell nuclei in both the trophoblast and ICM compartments (Fig. 4). By Day 5, virtually all of the cells in the embryo displayed BrdU incorporation, persisting through Days 9, 11 and 13 (fig. 4). As noted above, there was substantial trophoblastic outgrowth in some embryos recovered at Day 13 after prolactin-mediated reactivation, and intense BrdU staining defined the ICM of the embryo (Fig 4).

Protein synthesis in the embryo was assayed during the escape from diapause by determination of the incorporation of ^{35}S -methionine. Embryos in diapause displayed the lowest levels of methionine incorporation (Fig. 5). The first significant increase could be detected at 72 h after initiation of PRL treatment ($P < 0.05$), and a logarithmic increase was observed up to Day 11, two days before implantation (Fig. 5, $P < 0.01$).

3.4.3 The Growth Potential of ICM and Trophoblast

To further characterize termination of embryonic diapause, ICM and trophoblast cells were dissected from embryos in diapause and embryos from Day 5 or Day 9 after PRL reactivation and their potential for mitosis was examined in vitro. FGF4 was added to the trophoblast stem cell medium to maintain replication, presumably in the absence of differentiation, as shown in the mouse [12]. With a single exception (Table 1) neither trophoblast nor ICM cells from embryos collected during diapause showed potential for growth in vitro. Trophoblasts from Day 5 embryos yielded cultures of trophoblast cells that displayed the capacity to replicate in vitro. This potential for mitosis of the trophoblast was greatly reduced in embryos taken at Day 9 after activation (Table 1). ICM cultures displayed a different pattern of replication in that the majority of the cultures from embryos at Day 5 after activation did not appear to replicate in vitro, while all cultures from Day 9 demonstrated vigorous replication (Table 1 and Fig. 6). ICM and trophoblast cells exhibited different morphology (Fig. 6). Cells from the ICM, which have the potential to form the embryo proper, were cuboidal or epithelial-like throughout the culture (Fig 6A). In contrast, the trophoblastic cells in the center of explants were smaller, rounded and contained larger nuclei, replete with perinuclear lipid inclusions (Fig. 6B). Those at the

periphery acquired a pavement block phenotype, while retaining a higher nucleus: cytoplasm ratio than the ICM explants (Fig. 6B). As cultures progressed, trophoblastic vesicles formed and detached from the monolayer (Fig. 1).

3.4.4 Provenance of FGF4 and Its Effects on Mink Trophoblast Cell Cultures

We then examined the occurrence of expression of FGF4 and FGFR2, the isoform of its receptor associated with early embryo development in the mouse [16]. Figure 7 depicts the results of PCR amplification of FGF4, FGFR2 and the control housekeeping gene, GAPDH, in reverse-transcribed RNA representative of groups of 3-5 whole embryos collected during diapause and at various times after reactivation. FGF4 transcript abundance was low during diapause, followed by an increase to a relatively constant level from Day 3 to Day 11 after activation. FGF4 transcripts were not detected in cultured trophoblast cells nor were they present in the fibroblast feeder layer. They were abundant in the ICM in culture. FGFR2 mRNA was not detected in the whole embryo until Day 5 after activation, after which time it was present. At Day 9, there was an apparent reduction in some samples. Strong expression of FGFR2 was observed in both trophoblast cultures and in the feeder layer of fibroblasts. Transcript abundance was low but detectable in ICM cultures that had been isolated from the feeder layer (Fig. 7). Together, the evidence indicates that the ICM is the source of FGF4 and its cognate embryonic receptor, FGFR2, is present on trophoblast and ICM cells, beginning soon after activation of the embryo.

To further define the role of FGF4 in trophoblast proliferation, we plated trophoblastic vesicles in gelatine-coated wells in the presence and absence of this growth factor. The consequent colonies were approximately round, and we measured proliferation

by determination of the maximum diameter of each. As can be seen in Figure 8a, trophoblast cultures did not change over 48 h of culture in the absence of FGF4. In contrast, significant growth and expansion of cultures was observed as early as 6 h after addition of FGF4 in fibroblast-conditioned medium, and the cultures containing this growth factor had persistent growth through 48 h to approximately threefold contemporary control values (Fig. 8a). Growth over 7 days, estimated by counting nuclei (Fig 8b), indicated that, after an initial period of relatively slow proliferation, there was rapid cell replication in cultures containing FGF4, relative to control cultures subjected to fibroblast-conditioned medium without FGF4. Regression analysis indicated highly significant ($P < 0.01$) linear growth of both cultures for the period from 3 to 7 days after initiation of culture. The doubling time, calculated from the slope of the regression line, was 1.4 days for cultures containing FGF4, compared to 4.0 days in the absence of the growth factor. Cultures containing FGF4 reached confluence at 8-9 days after initiation.

3.5 DISCUSSION

Comparative studies of mammals that display obligate embryonic diapause have shown that the mechanisms of embryonic reactivation differ according to species, presumably due to convergent evolution of this phenomenon [22]. The mink displays a unique pattern of diapause and reactivation [3, 23, 24]. In the six days following ovulation and fertilization, the embryo develops into a classic carnivore blastocyst, encapsulated in the much-expanded zona pellucida of the oocyte, supplemented by glycoproteins from the reproductive tract. The embryos then enter developmental arrest, first in the cranial reaches of the uterus, followed by a later migration that distributes them throughout the uterine

horns. When the embryo is reactivated, it begins a poorly understood sequence of developmental events that culminate in implantation. We have previously shown that predictable termination of diapause can be provoked by exogenous prolactin treatment [6], and we have employed this paradigm in the present study. Herein, we provide the first information on the embryonic events that occur during the escape from diapause and consequent reinitiation of the developmental process.

3.5.1 Embryo Expansion in the Reactivated Blastocyst

By sampling of a large number of animals between diapause and around the time of expected implantation, Stoufflet et al. [25] demonstrated that the diameter of mink blastocysts recovered from the uterus varies from 0.2 to 2.0 mm, presumably indicating a progression of expansion from diapause to implantation. We provide the first data on the sequence of expansion by showing that embryo volume increases gradually in the first few days after reactivation, followed by more rapid increase in volume during Days 9-13. A similar spectrum of embryo expansion has been described for the spotted skunk [2]. The mink model is consistent in some ways with the roe deer, where the embryo first expands slowly at the termination of diapause [26]. In the roe deer, this is followed by rapid elongation of the embryo in the ruminant pattern until the time of implantation [26].

Increases in the volume of the mink blastocyst have been attributed to fluid uptake, based on the apparent low levels of protein synthesis recorded during embryo expansion [8]. This conclusion is not in agreement with the observations in the present investigation, as the first definable increase in volume follows the first definable increase in protein synthesis (^{35}S -methionine uptake) by two days. Further, new protein synthesis, rather than

solely fluid uptake [27], appears to be the mechanism for growth and expansion from Day 5 after activation through implantation. Our ^{35}S -methionine uptake data demonstrating lowest incorporation during diapause are in agreement with reports indicating that only a basal level of amino acid uptake is present in spotted skunk embryos in diapause [28, 29]. The current results, along with previous studies in the skunk [1, 29], suggest the rate of protein synthesis increases somewhat slowly after escape from obligate diapause. The early stages of activation of the roe deer embryo are similarly characterized by modest uptake of ^{35}S -methionine and, as in the mink, the logarithmic phase is observed later in the activation process [30]. This is in contrast with observations of a precipitous increase in amino acid uptake following reinitiation of development in the mouse blastocyst at the termination of facultative diapause [31]. The more rapid response in the mouse may reflect the fact that the rodent embryo implants within 48 h after activation, while the current study shows that the mustelid embryos implant some 10 days after the first measurable indication of protein synthesis.

An earlier study by Polejaeva et al. [32] indicated that there were direct effects of prolactin on increasing development of mink embryos in culture. Doses of 5-10 $\mu\text{g/ml}$ were required, and embryos collected 13-16 days after mating responded to prolactin, while those collected on the seventh day after copulation did not. The mean diameter of the older blastocysts was 0.4 mm, similar to activated embryos in the present investigation, indicating that embryos that responded to prolactin in vitro had already escaped from diapause. It is well known that elevations in prolactin precede implantation [33] and that prolactin alone induces embryo implantation in the hypophysectomized mink [6]. It is

possible that exogenous prolactin we employed to terminate diapause also had direct effects on embryo development.

3.5.2 DNA Synthesis and Cell Proliferation Following Activation

In the present study, BrdU incorporation was not observed in mink embryos in diapause, in keeping with previous observations of an absence of mitotic activity [7] and ^3H -thymidine uptake [28] in developmentally arrested mink embryos. With a single exception, none of the ICM or the trophoblast explants from embryos in diapause in the present study proved capable of proliferation, further supporting the view that mitotic activity is arrested during the delay that precedes implantation in the mink. At Day 3 after activation, there was clear evidence of BrdU incorporation throughout the mink trophoblast and in the ICM, indicating that the S-phase of the cell cycle had been reinitiated and was occurring during the 16 h of BrdU incubation. At Day 5, all trophoblast explants displayed the capacity for replication in vitro, as judged by the growth of colonies over 7 days, while the ICM proved less capable of in vitro proliferation. Concurrent observations of BrdU incorporation and in vitro proliferation at Day 9 after activation indicated that both trophoblast and ICM cells were in the S-phase of the cell cycle but that proliferation of the trophoblast in culture was restricted. It has been reported that the mink trophoblast displays chromosomal polyteny resulting from endoreduplication before implantation [34]. This bears some similarity to the rodent trophoctoderm, which has been shown to undergo endoreduplication to form the trophoblast giant cells during the process of terminal differentiation of this tissue [35]. The current observation that the mink trophoblast

synthesizes DNA at Day 9 after activation, coupled with the view that the trophoblast appears not to readily proliferate in vitro, suggests that endoreduplication may be occurring.

3.5.3 FGF4 and FGFR2 Expression in Mink Embryos and Embryo-Derived Tissues

In rodents, FGF4 is not required for preimplantation development, as null mutation of the FGF4 gene does not impair the advance of the mouse embryo to the blastocyst stage [14]. Of the known FGF receptors, FGFR2 expression appears to be the earliest in embryonic development in the mouse [15]. Targeted disruptions of the FGF4 [14] and FGFR2 [16] genes are embryo lethal and result in the same phenotype, i.e., interference with peri- and postimplantation proliferation of both trophoblast and ICM. The current results demonstrate that FGF4 is expressed in the mink embryo during diapause and following activation, while FGFR2 was first seen at Day 5 after activation. The substantial BrDU incorporation into embryos collected at Day 3 after activation, a time when the FGFR2 expression was absent, suggests that early proliferative events may not be mediated by this FGF receptor isoform. The abundance of signal for FGF4 and FGFR2 at Day 5 and thereafter suggests that FGF4, acting through the FGFR2, may participate in the events associated with postactivation development in the carnivore embryo.

3.5.4 ICM and Trophoblast Cell Lines Derived From the Mink Embryo

We demonstrate that the separated components of the mink embryo, the ICM and the trophoblast, can be cultured, passaged, frozen, thawed, and cultures reconstituted. Mixed cultures of mink ICM and trophoblast have previously been reported [23, 32], and there is a report of isolation of mink ICM by microsurgery and subsequent culture [23].

Sukoyan et al, [23] demonstrated that the ICM lines from the mink embryo had the characteristics of embryonic stem cells [36]. The current mink ICM lines, as well as others that we have derived from preimplantation embryos, did not differ in any obvious way from those previously reported [23].

This appears to be the first demonstration of isolation of trophoblast cells and the establishment of trophoblast cell lines from the carnivore embryo. FGF4 clearly enhances mink trophoblast cell attachment and replication in vitro. This concurs with the rodent model, where FGF4 promotes proliferation of trophoblast cells [12]. We report herein that FGF4 transcripts are present in whole embryos and in ICM cultures but are absent in cultured trophoblast cells. In the mouse, it has been shown that FGF4 is expressed by the ICM [37]. We suggest that the ICM of the mink embryo is the source of FGF4 for trophoblast proliferation and that its expression increases rapidly with embryo activation.

It is not currently known whether mink trophoblast cell lines we have isolated have stem cell potential, i.e., the capacity for continued proliferation and totipotency [36]. In the mouse model, trophoblast cells derived from embryos at either 3.5 or 6.5 days after fertilization display characteristics of differentiation in the form of expression of lineage-specific genes of the incipient placenta [38]. Nonetheless, in the presence of FGF4, mouse trophoblast cells retain their stem cell totipotency if transplanted back into the embryo, while removal of the growth factors drives them toward terminal differentiation into giant cells in vitro [36]. In this study, we show that the proliferative capability of mink trophoblast cells derived from Day 9 after activation of the embryo is consistently less than cells derived from Day 5, even in the presence of FGF4. Thus, it may be that

differentiation takes place in the mink trophoblast before implantation and earlier in the developmental sequence than in the mouse model [38].

In summary, we have investigated the process of escape from diapause by the mink embryo and have profiled changes that take place in diameter and protein and nucleic acid synthesis. The first non-significant changes that occur are in embryo size, apparently due to increased fluid uptake, and protein and DNA synthesis show marked increases within 72 h after the reinitiation of development. The ICM of the mink blastocyst expresses FGF4, and both trophoblast and ICM express receptors for FGF4, and these appear to play a role in preimplantation proliferation of embryonic components. We have examined the ability of embryo components taken at different times after initiation of embryo activation to proliferate in vitro and have demonstrated that the trophoblast from embryos at Day 5 after activation proliferates more readily than that from diapause or from Day 9 after activation, while cells from the inner cell mass replicate at a greater rate at Day 9. These findings raise a number of questions, including whether these cell lines have the characteristics of trophoblast stem cells and whether the endoreduplication that is believed present in vivo can be recapitulated in trophoblast lines in vitro.

3.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mira Dobias and Carmen Leveillé for excellent technical work and Richard Bennett and Sandra Ledoux for aid in collection of data during the early phases of experimentation.

3.7 REFERENCES

1. Enders AC, Schlafke S, Hubbard NE, Mead RA. Morphological changes in the blastocyst of the western spotted skunk during activation from delayed implantation. *Biol Reprod* 1986; 34: 423-437.
2. Mead RA. Embryonic diapause in vertebrates. *J Exp Zool* 1993; 266: 629-641.
3. Murphy BD, James DA. The effects of light and sympathetic innervation to the head on nidation in mink. *J Exp Zool* 1974; 187: 267-276.
4. Papke RL, Concannon PW, Travis HF, Hansel W. Control of luteal function and implantation in the mink by prolactin. *J Anim Sci* 1980; 50: 1102-1107.
5. Murphy BD, Mead RA, McKibbin PE. Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink. *Biol Reprod* 1983; 28: 497-503.
6. Murphy BD, Concannon PW, Travis HF, Hansel W. Prolactin: the hypophyseal factor that terminates embryonic diapause in mink. *Biol Reprod* 1981; 25: 487-491.
7. Baevsky UB. The effect of embryonic diapause on the nuclei and mitotic activity of mink and rat blastocysts. In: Enders AC (ed.) *Delayed Implantation*. Chicago: University of Chicago Press; 1963: 141-153.
8. Daniel JC, Jr. Studies on the growth of the mink blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967; 17: 293-302.
9. Daniel JC, Jr. Coincidence of embryonic growth and uterine protein in the ferret. *J Embryol Exp Morphol* 1970; 24: 305-312.
10. McRae AC. Effect of ovariectomy on blastocyst expansion and survival in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 239-247.

11. Kidder JD, Giles JR, Foote RH, Richmond ME, Salerno M. Allocation of inner cell mass and trophectoderm cells to the preimplantation blastocyst of the domestic ferret, *Mustela putorius furo*. J Exp Zool 1999; 283: 202-209.
12. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. Science 1998; 282: 2072-2075.
13. Rappolee DA, Basilico C, Patel Y, Werb Z. Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. Development 1994; 120: 2259-2269.
14. Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. Science 1995; 267: 246-249.
15. Orr-Urtreger A, Givol D, Yayon A, Yarden Y, Lonai P. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. Development 1991; 113: 1419-1434.
16. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 5082-5087.
17. Moreau GM, Arslan A, Douglas DA, Song J, Smith LC, Murphy BD. Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival in vitro of mink blastocysts in obligate diapause. Biol Reprod 1995; 53: 511-518.

18. Bordignon V, Smith LC. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol Reprod* 1999; 61: 1513-1520.
19. Bell JC, Smith LC, Rumpf R, Goff AK. Effect of enucleation on protein synthesis during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 603-608.
20. Betts D, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L, King W. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1077-1082.
21. Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* 2000; 63: 1034-1040.
22. Renfree MB, Shaw G. Diapause. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 353-375.
23. Sukoyan MA, Golubitsa AN, Zhelezova AI, Shilov AG, Vatolin SY, Maximovsky LP, Andreeva LE, McWhir J, Pack SD, Bayborodin SI, et al. Isolation and cultivation of blastocyst-derived stem cell lines from American mink (*Mustela vison*). *Mol Reprod Dev* 1992; 33: 418-431.
24. Hanssen A. The physiology of reproduction in the mink (*Mustela vison* Schreb.) with special reference to delayed implantation. *Acta Zool.* 1947; 28: 1-136.
25. Stoufflet I, Mondain-Monval M, Simon P, Martinet L. Patterns of plasma progesterone, androgen and oestrogen concentrations and in-vitro ovarian steroidogenesis during embryonic diapause and implantation in the mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* 1989; 87: 209-221.

26. Aitken RJ. Aspects of delayed implantation in the roe deer (*Capreolus capreolus*). J Reprod Fertil Suppl 1981; 29: 83-95.
27. Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. Front Biosci 2001; 6: D708-730.
28. Gulyas BJ, Daniel JC, Jr. Incorporation of labeled nucleic acid and protein precursors by diapausing and nondiapausing blastocysts. Biol Reprod 1969; 1: 11-20.
29. Rourke AW, Mead RA. Blastocyst protein synthesis during obligate delay of implantation and embryo activation in the Western spotted skunk. J Exp Zool 1982; 221: 87-92.
30. Lindqvist I, Einarsson B, Nilsson O, Ronquist G. The in vivo transport of ¹⁴C-alpha-aminoisobutyric acid into mouse blastocysts during activation for implantation. Acta Physiol Scand 1978; 102: 477-483.
31. Holmes PV, Bergstrom S. Induction of blastocyst implantation in mice by cyclic AMP. J Reprod Fertil 1975; 43: 329-332.
32. Polejaeva IA, Reed WA, Bunch TD, Ellis LC, White KL. Prolactin-induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells. J Reprod Fertil 1997; 109: 229-236.
33. Martinet L, Allais C, Allain D. The role of prolactin and LH in luteal function and blastocyst growth in mink (*Mustela vison*). J Reprod Fertil Suppl 1981; 29: 119-130.

34. Zybina EV, Zybina TG. Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int Rev Cytol* 1996; 165: 53-119.
35. Gardner RL, Davies TJ. Lack of coupling between onset of giant transformation and genome endoreduplication in the mural trophectoderm of the mouse blastocyst. *J Exp Zool* 1993; 265: 54-60.
36. Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 2001; 19: 477-482.
37. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 1995; 9: 2635-2645.
38. Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, Jaradat SA, Stagg CA, Usuda M, Yokota T, Niwa H, Rossant J, Ko MS. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res* 2002; 12: 1921-1928.

3.8 FIGURES AND TABLES

TABLE 3.1 Capacity for growth of inner cell mass (ICM) and trophoblast cells from mink embryos. The ratio of the number of ICMs and trophoblasts from diapause embryos and embryos collected at Days 5 and 9 after reactivation that showed growth potential in vitro.

	Diapause	Day 5	Day 9
ICM	0/3	1/5	5/5
Trophoblast	1/3	5/5	1/5

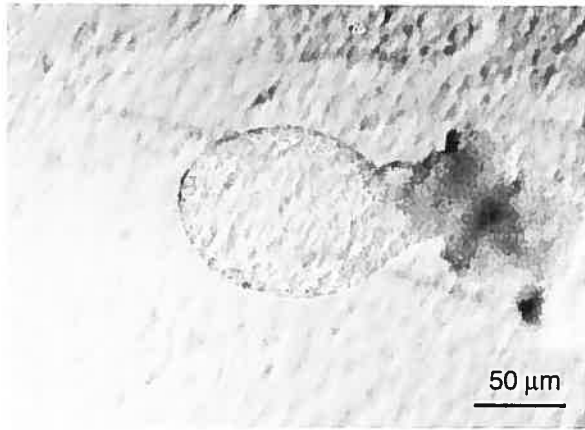


FIG 3.1 A trophoblast vesicle detaching from the monolayer of a trophoblast cell culture derived from a day 5 reactivated mink embryo. These vesicles were removed and individually plated on gelatin to form new trophoblast cell colonies.

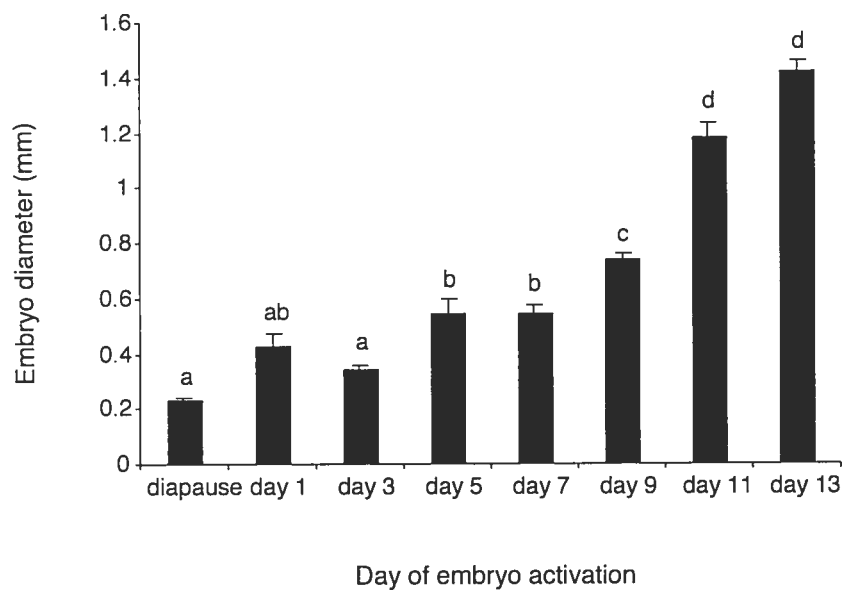
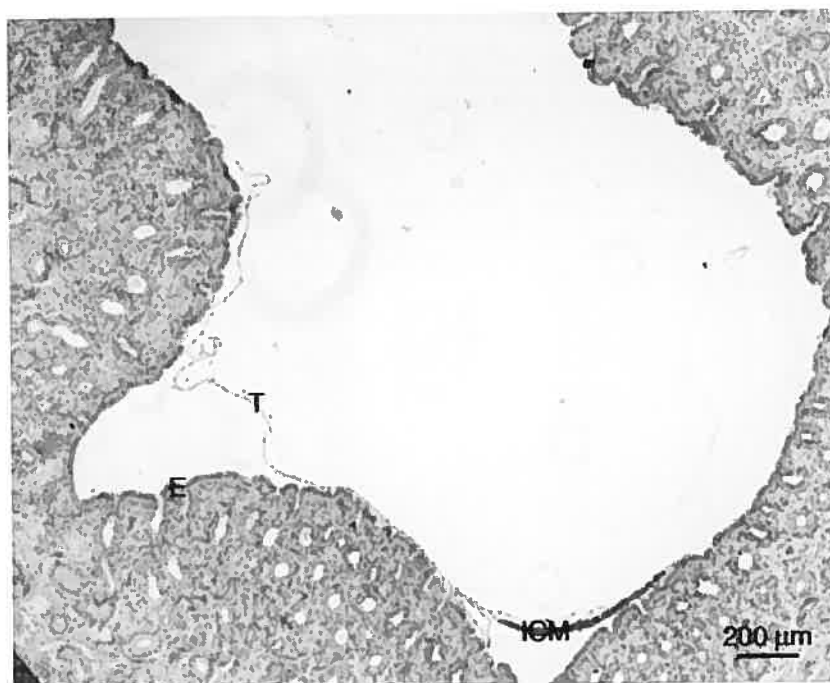


FIG 3.2 Progression of mink embryo expansion following reactivation by treatment of dams with PRL. Embryos were flushed from the uteri in diapause or Days 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 after prolactin-mediated escape from diapause. Individual diameters were measured by ocular micrometer. Each bar represents the mean (\pm SEM) of 10-56 embryos and means bearing different superscripts are different at $P < 0.05$.

A



B

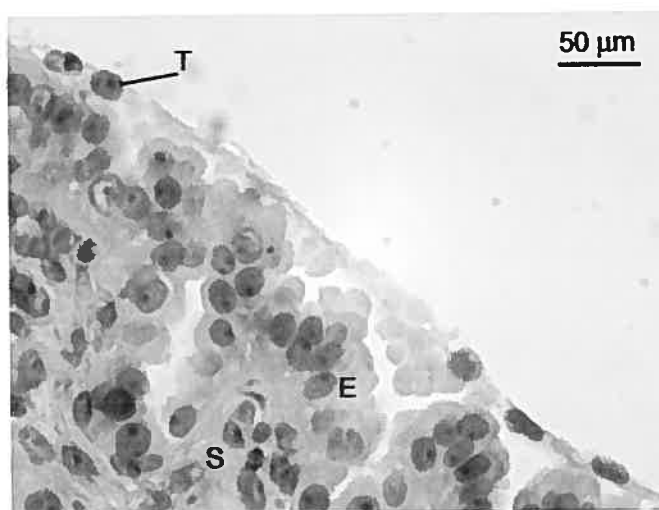


FIG 3.3 Implantation occurred in all but a few mink after 13 days of daily prolactin administration, as seen in uterine section of an implantation chamber, stained with hematoxylin-phloxin-safran. A) At low magnification, the inner cell mass (ICM), and a trophoblastic knob (T) invading the endometrial epithelium (E) on the mesometrial side of the uterus. Endometrial stroma is intact in early implantation stage. B) At a higher magnification, an implantation area showing invading trophoblast cells, epithelial cells and stroma (S).

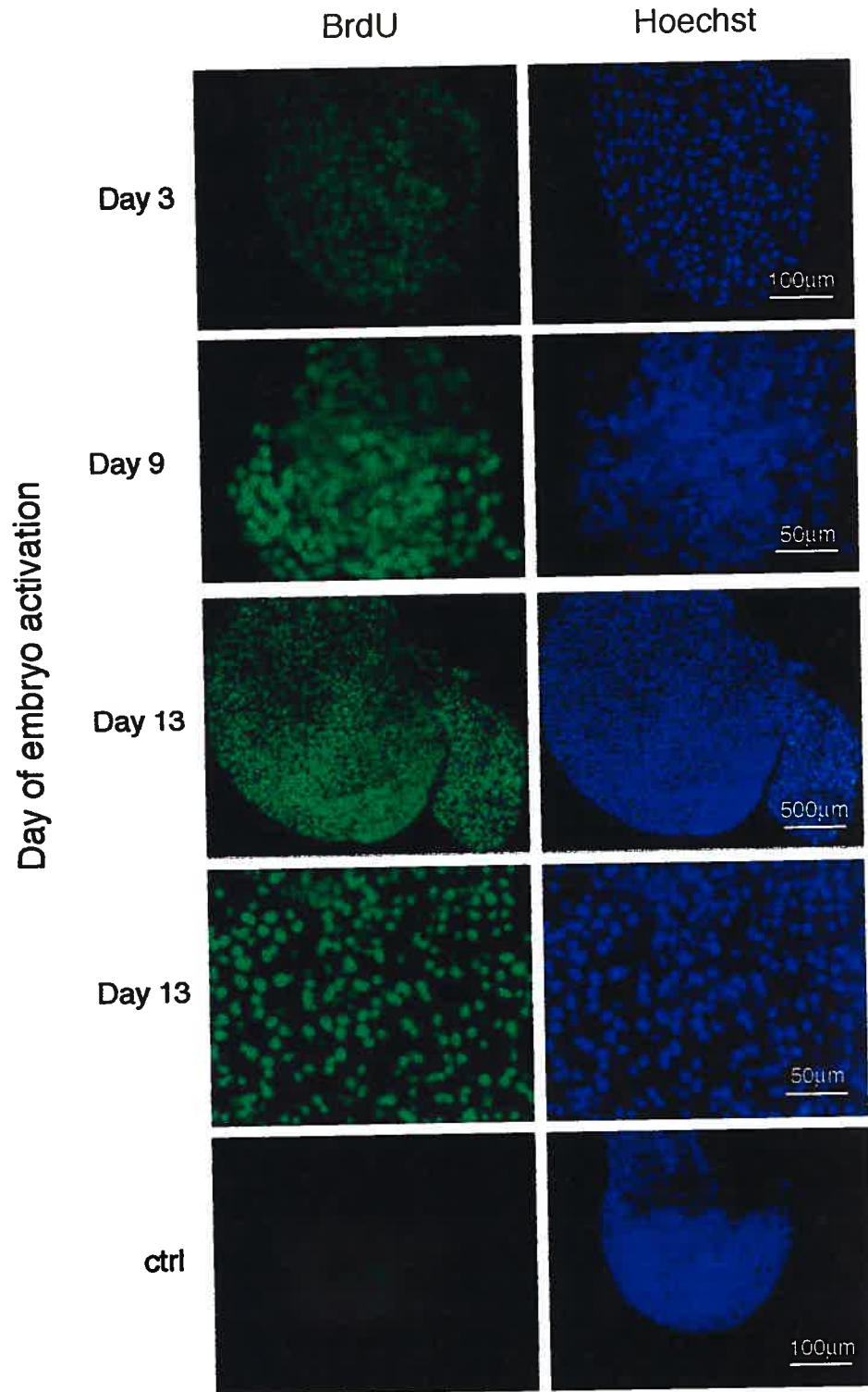


FIG 3.4 Incorporation of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was evaluated to determine DNA synthesis by mink embryos through the period of reactivation after obligate diapause. Embryos were readily flushed from uteri at diapause and Days 3, 9 and 13. Mouse anti-BrdU binding is visualized with fluorescein-labeled goat anti-mouse IgG (in green). The DNA stain Hoechst 33342 (in blue) was employed for visualization of nuclei. The embryo recovered on Day 13 that is depicted was hatching from the zona pellucida.

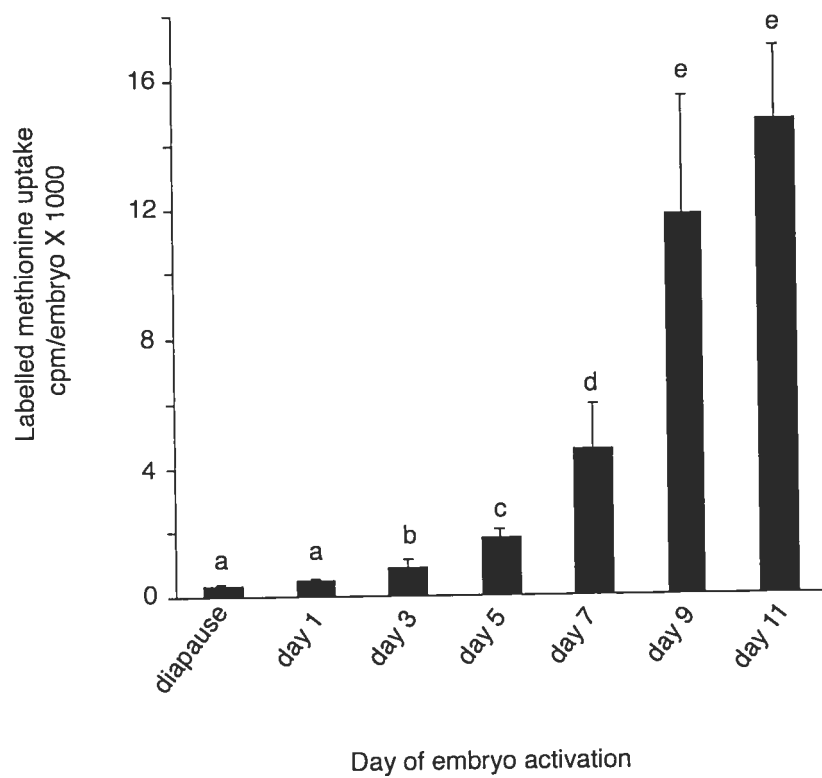
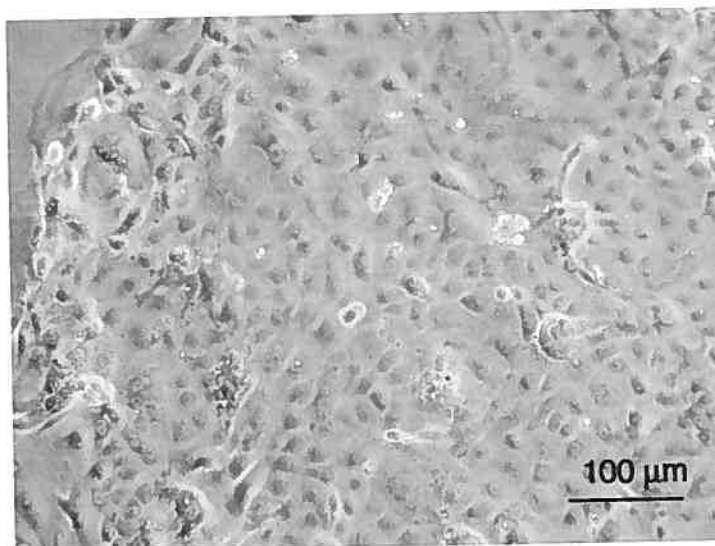


FIG 3.5 Protein synthesis in the embryo was assayed during the escape from diapause by determination of the incorporation of ^{35}S -methionine. Bars represent the mean (\pm SEM) of 3-5 embryos from diapause and Days 1, 3, 5, 7, 9 and 11 after reactivation of development by treatment of the dams with PRL. Means bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

A



B

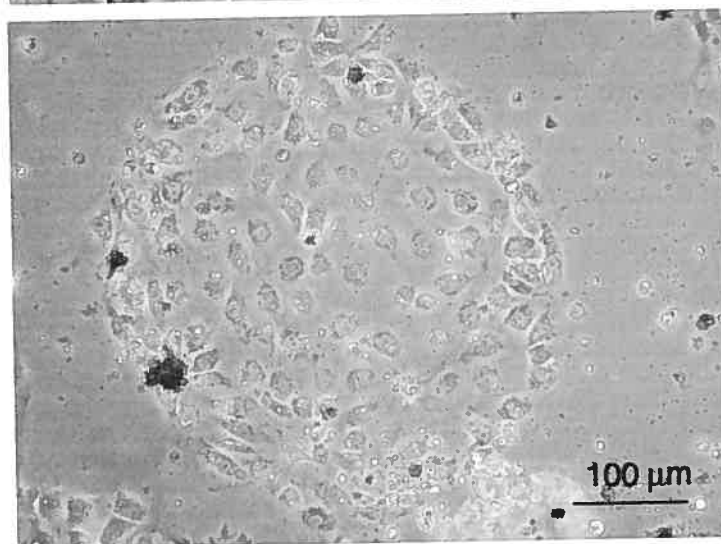


FIG 3.6 In vitro proliferation of trophoblast stem-like cells and embryonic stem-like cells from mink embryos. Brightfield micrographs of embryonic cells, comprising the embryonic stem-like cells (ES-like) derived from the inner cell mass (ICM, A), and the trophoblast stem-like (TS-like, B) cells derived from the trophoblast of Day 5 and Day 9 embryos after reactivation. These cells are cultured on the top of a mouse fetal fibroblast feeder layer. Note the epithelial or cuboidal morphology of the ES-like cells and the circular morphology of the TS-like cells, which also displayed higher nuclear: cytoplasmic ratio and abundant lipoid vesicles.

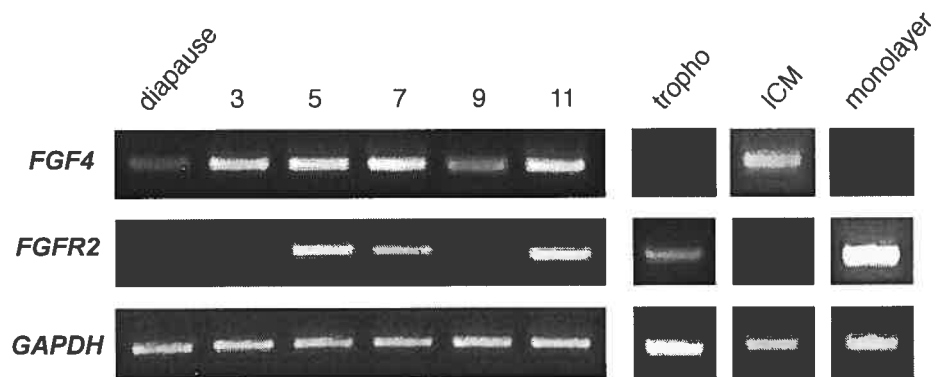


FIG. 3.7 Occurrence of transcripts for fibroblast growth factor 4 (FGF4) and fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2) in embryos recovered at diapause and at 2-day intervals through Day 11 after activation. Transcripts were also amplified from trophoblast (tropho) and inner cell mass (ICM) cultures as well as from the fibroblast feeder monolayer (monolayer) employed in ICM cultures. The housekeeping gene GAPDH was amplified in the embryos as a control.

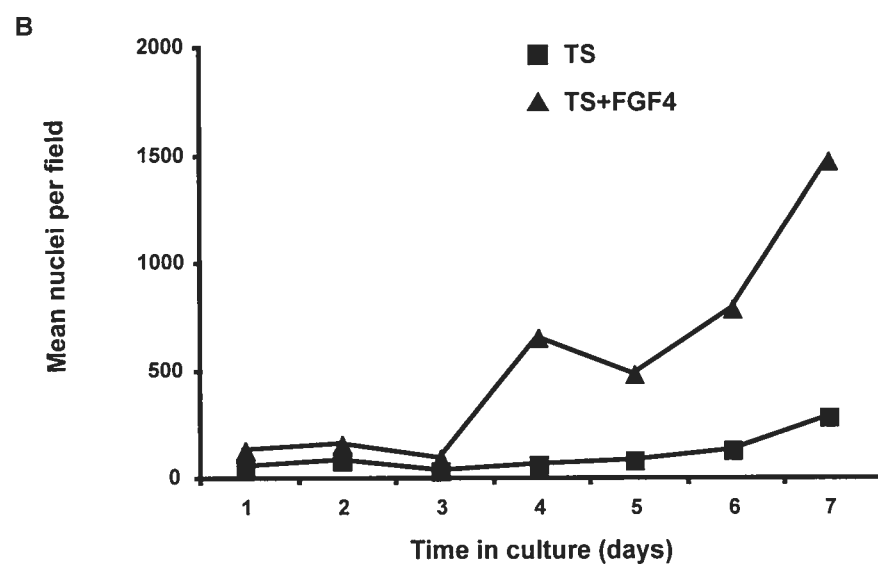
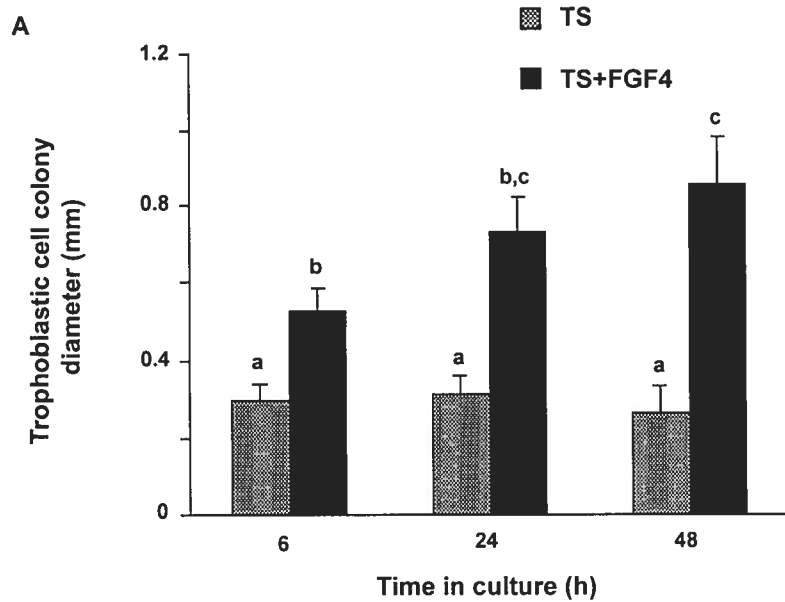


FIG. 3.8 A) Mean (\pm SEM) of the maximum diameters of trophoblast cell line colonies derived from embryos taken at Day 5 after reactivation. Diameters were measured after 6, 24 or 48 h of culture in medium containing FGF4 (black) or medium alone (dots). B) Growth curves for mink trophoblast cells in culture. Frozen cells from embryos taken at Day 5 after reactivation were cultured in conditioned medium in the presence (triangle) or absence (square) of FGF4, and the mean number of nuclei was counted from ten fields for each cell culture, from Day 1 to Day 7. Points represent the mean number of nuclei in five preassigned fields of each culture well.

4.0 ARTICLE DEUXIÈME

Spatio-temporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodelling and angiogenesis.

Joëlle A. Desmarais^{1*}, Mingju Cao^{2*}, Andrew Bateman² and Bruce D. Murphy¹

Adresses

¹ Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

² Endocrine Research Laboratories, Department of Medicine, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

* These authors contributed equally to this work.

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to B.D.M. and an Operating grant from the Canadian Institute for Health Research to A.B.. J.A.D., M.C., A.B., and B.D.M. have no real or potential conflicts of interest to declare with entities related to the material being published.

4.1 ABSTRACT

Embryo implantation in the mink is preceded by a variable but obligate period of delay in development. Under the influence of progesterone and unknown luteal factors, the mink embryo implants 11-13 days following its exit from diapause. Recent work suggests that the progranulin, a growth factor and secreted glycoprotein, is involved in trophoblast proliferation, placental development and endometrial differentiation in the mouse, but the spatio-temporal pattern of progranulin expression around the time of implantation has not been examined in any species. Using the mink model of delayed implantation and endotheliochorial placentation, we followed the distribution of progranulin in trophoblast and endometrium during pre- and early post-implantation gestation *in vivo*. A partial sequence of the mink progranulin gene was cloned and sequenced, and comparative sequence analysis revealed that mink progranulin exons 1 and 2 share 86.6 % of nucleic acid sequence identity with humans, 82.4% with mouse and 94.9% with the dog. By *in situ* hybridization, we show that mink progranulin transcript expression in the cytotrophoblast and in epithelial and stromal endometrial cells is associated with implantation and early placental formation. Immunohistochemistry revealed that progranulin protein is strongly expressed in endometrial luminal and glandular epithelium around the time of implantation. In the incipient labyrinth, progranulin expression is localized to cytotrophoblasts, fetal capillaries, as well as to the hypertrophied maternal endothelial cells. This study demonstrates that high levels of progranulin expression correspond to the active cell proliferation, remodelling and angiogenesis occurring during the establishment of the placenta in the mink.

4.2 INTRODUCTION

Embryo implantation in the mink is preceded by an obligate delay in development of variable length, occurring at the blastocyst stage (Enders R. K., 1952, Hansson, 1947). This delay is terminated by lengthening of the photoperiod associated with the vernal equinox, which occurs in March in the Northern hemisphere (Duby & Travis, 1972, Enders R. K., 1952, Martinet *et al.*, 1981, Murphy & James, 1974, Sundqvist *et al.*, 1988). The proximal event in termination of preimplantation delay is the secretion of prolactin, that reinitiates CL development and the uterine-priming progesterone secretion (Lopes *et al.*, 2004, Martinet *et al.*, 1981, Murphy *et al.*, 1981, Papke *et al.*, 1980). Resumption of embryo development in the mink is characterized by renewed nucleic acid and protein synthesis by trophoblast and ICM cells of the blastocyst, accompanied by a logarithmic increase in blastocyst diameter (Desmarais J. A. *et al.*, 2004). Under the influence of progesterone and unknown luteal factors, the mink embryo implants 11-13 days following its exit from diapause (Desmarais *et al.*, 2004, Murphy *et al.*, 1983), and postimplantation gestation requires an invariable 30 days (Hansson, 1947, Murphy & James, 1974).

As described in the ferret (*Mustela putorius*) and the spotted skunk (*Spilogale gracilis*), mustelid implantation is achieved by penetration of the endothelial epithelium by trophoblast cells in early stages of differentiation (Enders A. C. & Schlafke, 1972, Enders A. C. & Mead, 1996). Following trophoblast attachment in the ferret, the syncytiotrophoblast cells invade the endometrial tissue and the endometrial glands are progressively transformed into a maternal symplasma as the syncytiotrophoblast advances (Gulamhusein & Beck, 1973, 1975). During syncytiotrophoblast invasion, the

cytotrophoblast proliferates to eventually form the chorionic villi (Gulamhusein & Beck, 1973, 1975). In the mink, the placenta is villous and endotheliochorial (Enders R. K., 1952, Krebs *et al.*, 1997), less invasive than mouse or human haemochorial placenta, as the blood vessels of the mother become surrounded by trophoblast but are not destroyed (Steven, 1975). In the labyrinth region of the placenta, extremely enlarged maternal endothelial cells can be observed (Backlin *et al.*, 1998, Jones C. J. *et al.*, 1997). This phenomenon also appears in other carnivores, but it is more pronounced in mink (Backlin *et al.*, 1998, Jones C. J. *et al.*, 1997, Krebs *et al.*, 1997).

Recent work suggests that progranulin a secreted glycoprotein growth factor is involved in mouse trophoblast proliferation (Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2005), placental development and endometrial decidualization (Daniel *et al.*, 2003). Progranulin, also known as granulin-epithelin precursor (Zanocco-Marani *et al.*, 1999), proepithelin (Plowman *et al.*, 1992), PC cell derived growth factor (Zhou *et al.*, 1993) or acrogranin (Baba *et al.*, 1993b), is a 66-88 kDa protein (Zhou *et al.*, 1993) comprising 7.5 granulin/epithelin consensus sequences, each of these consisting of a conserved 12-cysteine motif (Bhandari *et al.*, 1992). The granulin/epithelin domains of progranulin are unique and therefore, progranulin cannot be classified into any known growth factor families, although a distant common origin with epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor α (TGF α) family of growth factors has been suggested (Bateman & Bennett, 1998, Hrabal *et al.*, 1996). Progranulin expression is found across virtually all tissues in mammals (Baba *et al.*, 1993a, Bhandari *et al.*, 1993, Daniel *et al.*, 2000). Abundant transcript expression is found in rapidly dividing epithelia, i.e. keratinocytes or enterocytes from the deep crypt of

the digestive tract (Daniel *et al.*, 2000), suggesting a role in epithelial proliferation. Progranulin has also been associated with tumor progression and invasiveness in adrenocortical carcinomas (He *et al.*, 2002), glioblastomas (Liau *et al.*, 2000), renal carcinomas (Donald *et al.*, 2001) and ovarian as well as breast cancers (Jones M. B. *et al.*, 2003, Tangkeangsirisin & Serrero, 2004, Tangkeangsirisin *et al.*, 2004).

Progranulin transcripts have been detected in rodent oocytes, spermatocytes and spermatogonia (Daniel *et al.*, 2000, Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Suzuki & Nishihara, 2002) and have been found in the embryo throughout pre-implantation development (Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2005). After fertilization, the levels of progranulin mRNA slowly decline until the 4 cells stage embryo in the mouse, and rise again in the 8 cells stage embryo (Diaz-Cueto *et al.*, 2000). Progranulin can promote mouse blastocyst formation by enhancing trophoblast proliferation, blastocyst cavitation and expansion (Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2005). Progranulin also stimulates hatching, adhesion and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro* (Qin *et al.*, 2005). In the post-adhesion blastocyst, progranulin mRNA becomes more abundant than in the pre-adhesion blastocyst (Qin *et al.*, 2003). Furthermore, progranulin expression in the mouse is strongly induced in the primary giant cells of the placenta, and in the decidual cells of the maternal endometrium (Daniel *et al.*, 2003).

In vitro studies conducted on mouse blastocysts suggests that progranulin acts as a key player in embryo implantation and placental development, but there is a lack of direct confirmation in the literature. We therefore employed the mink model of delayed

implantation and endotheliochorial placentation to investigate the expression of progranulin in trophoblast and endometrium during embryo implantation *in vivo*.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Animals

Primiparous and multiparous Pastel and Dark female ranch mink (*Mustela vison*) were purchased from Mr A. Richard (St.Damase, QC, Canada), and were bred according to usual commercial farming procedures. The biological samples were collected during the normal breeding season in March. All procedures involving live animals were submitted to, and approved by, the Comité d'éthique de l'utilisation des animaux, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, and were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. To terminate pre-implantation delay, 1 mg kg⁻¹ day⁻¹ ovine prolactin (Sigma, Oakville, ON, Canada) was administered i.m. daily to the animals, for 11 days, after which implantation occurs (Desmarais J. A. *et al.*, 2004). Uterine tissues and implantation sites were collected after 9 days of prolactin treatment, and 0, 1, 2 or 5 days after implantation in experimental groups representing the pre- and early post-implantation period. The tissues were flash frozen in liquid nitrogen for RNA preservation, or fixed overnight with 4% (w/v) paraformaldehyde (PAF) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, rinsed 3 times overnight in PBS, and processed for paraffin embedding. Tissues were sectioned at 5 µm for in situ hybridization or immunohistochemistry.

4.3.2 Cloning of mink partial cDNA sequence

Total RNA was isolated from mink uterine tissues including the implantation site, with the RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The isolated RNA was treated with RNase-free DNase 1 (Ambion, Austin, TX) to remove DNA, and cognate cDNA produced by employing the Superscript II Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. A polymerase chain reaction (PCR) was conducted with canine specific progranulin primers, to amplify a mink progranulin partial cDNA sequence. The forward primer sequence is 5'- AGA TGG TCA GTT CTG CCC TGT G - 3' and the reverse primer sequence is 5'- ACA CGA CAC GGC CTC TGG GAA - 3'. For PCR, 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) was used per µg of DNA in a 20 µl PCR reaction, and the amplification was conducted in a PTC-200 Peltier thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA), programmed for an initial denaturation step at 94° C for 3 min, followed by 35 cycles of 95° C for 30sec, 56° C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and a final elongation step at 72° C for 3 min. The 214 bp PCR fragment was purified from an agarose gel using an extraction kit (Qiagen), ligated into a pDrive cloning vector (Qiagen) and the clones were amplified in an XL1-blue bacterial strain. The amplified plasmids were purified with a Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen), and digested with EcoR1 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) to confirm the presence of the insert. The purified plasmid was sequenced with an automated sequencer by the Services d'analyse et de synthèse SCF, Université Laval (Québec, QC, Canada), to confirm the identity of the PCR product. Multiple sequence alignment was conducted with DNasis v2.0 software (Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan), and the percentage of

homology was calculated thereafter. The accession numbers of the sequences used for the alignment can be found in GenBank as follows: human: NM_002087, dog: XM_537620, mouse: NM_008175. The mink progranulin partial coding sequence was entered in GenBank (accession number EF566010).

4.3.3 In situ hybridization

Human-specific digoxigenin-UTP-labeled progranulin RNA sense and anti-sense probes of 237 bp were generated as described (Daniel *et al.*, 2000). In situ hybridization was carried out as in (Daniel *et al.*, 2000) with modifications. Paraffin sections were deparaffinized in Citrosolv (Fisher, Whitby, ON, Canada) and rehydrated in a graded series of ethanol. Tissues were post-fixed in 4% PAF, pH 7.4 (Fisher) and washed in 0.5X SSC buffer. Permeabilization of the tissue was carried out by incubation with 0.2M HCl for 5 min, followed by incubation with proteinase K (3.5µg/ml) in 100mM Tris-HCl, 50mM EDTA buffer, pH 8.0, at 37° C for 15 min. Another post-fixation step with 4% PAF was conducted and slides were washed thoroughly in PBS and 0.5X SSC. The sections were then pre-hybridized for three hours in hybridization solution (5x SSC, 5X Denhardt's solution, 50% (v/v) deionized formamide (Bioshop, Burlington, ON, Canada) and 250 µg/ml tRNA (Roche, Indianapolis, IN, USA)), and hybridized with 75 ng of digoxigenin-UTP-labelled RNA probes for 18 hours at 42° C. After stringency washing with different concentrations of SSC at 50° C, sections were blocked with 1% of Blocking Reagent (Roche) in 1M maleic acid, 0.15M NaCl buffer, pH 7.5, and were incubated with 750mU/ml Anti-Digoxigenin-AP-conjugated antibody (Roche). The unbound antibody conjugate was washed off and sections were incubated with freshly prepared NBT-BCIP

colour substrate (Roche) in a 100mM Tris, 100mM NaCl solution, pH 9.5, until the desired signals were obtained. The reaction products were visualized with a brightfield Leica AS LMD microscope (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany). For each sample, two successive slides were incubated either with sense or anti-sense probe to monitor non-specific hybridization signal.

4.3.4 Immunohistochemistry

Immunohistochemical localisation of mink progranulin protein was carried out using antiserum from a rabbit immunized against human progranulin fragment, generated in house. Sections were deparaffinized in Citrosolv (Fisher) and rehydrated in a graded series of ethanol. Antigen retrieval was performed by boiling the slides in a 10mM sodium citrate solution for 20 min in a microwave oven. Dako LSAB2® System-HRP kits (DakoCytomation, Carpinteria, CA) were employed following the manufacturer's recommended protocol. Briefly, endogenous peroxidases were blocked with 3% (v/v) peroxide solution for 30 min and sections were treated with 3% BSA and 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS for three hours at room temperature to block the non-specific binding, and thereafter, were incubated with rabbit-anti-serum against human progranulin, diluted 1:100 in antibody diluent (DakoCytomation), in a humidified chamber, over night at 4°C. The biotinylated secondary antibody, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) and diaminobenzadine (DAB) substrate were subsequently employed for signal visualization, according to the manufacturer's (DakoCytomation) recommended protocol. Between steps, sections were washed three times, for 3 min. Finally, brown precipitate was observed at the antigen site and the sections were briefly counterstained with Harris modified hematoxylin

(Fisher). Before mounting, sections were dehydrated in the series of ethanol. In the control slides, rabbit antiserum against progranulin incubation was replaced by a pre-immune rabbit serum incubation. The signals were visualized with a brightfield Leica AS LMD microscope (Leica Microsystems Inc.).

4.4 RESULTS

4.4.1 Cloning and sequence analysis of mink progranulin partial cDNA

A partial sequence (214 bp) of the mink progranulin gene was cloned and sequenced, and sequence homology between the mink and three other mammalian species was determined. In Figure 1, the mink progranulin sequence is presented, as well as the comparison among four mammalian progranulin sequences. This analysis revealed that mink progranulin exons 1 and 2 share 86.6 % of nucleic acid sequence identity with the human, 82.4% with the mouse and 94.9% with the dog, a closely related carnivore species. Exons 1 and 2 encode for 2 hemidomains of highly conserved granulin/epithelin motifs (Bhandari & Bateman, 1992).

4.4.2 Progranulin mRNA is expressed in mink endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation

To investigate the spatio-temporal pattern of progranulin mRNA expression in the endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation in the mink, we employed in situ hybridization. Nine days after termination of embryonic diapause by exogenous prolactin treatment, but before implantation, there is a strong hybridization

signal indicative of progranulin mRNA expression in the mink uterus, throughout the endometrial epithelium (both luminal and glandular, Fig. 2a). On the day of implantation, when the trophoblast makes contact with the maternal epithelium, progranulin mRNA was clearly expressed in the invading trophoblast (Fig. 2c). There is also notable expression in the transforming glandular epithelium and in the stroma, at the blastocyst localization (Fig. 2e,f). During villi formation in the incipient placenta, progranulin mRNA expression is observed mainly in the cytotrophoblast cells, which are actively undergoing cell division to form the chorionic villi (Fig. 2h). This expression is evident in the basal and transformed endometrial glands as well (Fig. 2i). Sense control hybridizations (Fig. 2b, d, g, j) revealed no non-specific signal.

4.4.3 Progranulin protein is expressed in mink endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation

To correlate progranulin mRNA expression with expression of the protein, immunohistochemistry was conducted in mink endometrial and trophoblastic tissues around the time of implantation. In the mink uterus, nine days after termination of embryonic diapause by exogenous prolactin treatment, but prior to implantation, progranulin protein is present in the cytoplasm of the cells of the endometrial glands as well as the luminal epithelium, (Fig. 3a, b). The day of embryo implantation (day 0), the uterine glands undergo hypertrophy and elongation, while the trophoblast makes contact with the maternal epithelium. Progranulin protein is highly expressed in trophoblast cells (Fig. 3d), as well as in the transformed epithelium of the glands, and in the stroma surrounding the glands (Fig. 3f). At this time, progranulin protein is also present in the intact basal glands.

While progranulin expression is absent in the maternal blood vessels located near these basal glands, it is otherwise present in the blood vessels in the transformed gland area (fig. 3h, arrowheads), indicating that progranulin is preferentially expressed in the newly formed maternal blood vessels. Together, these results suggest that progranulin is involved in implantation during trophoblast attachment, endometrial transformations, endometrial gland proliferation and maternal angiogenesis.

As trophoblast invasion proceeds, the chorionic villi are formed in the incipient labyrinth of the placenta. Progranulin protein remains elevated in the cytotrophoblast during the first days following implantation (day 1, Fig. 4a and day 2, Fig. 4b). Some expression is also clearly discernable in the syncytiotrophoblast as it progresses into the maternal endometrium (Fig. 4a). Progranulin expression can be continuously observed in the transformed (Fig. 4d, g) and intact endometrial glands (Fig. 4c, g), and at a lower degree in the stroma (Fig. 4c, d). As above, the progranulin expression in the cytotrophoblast of the forming villi suggests a role for progranulin in cytotrophoblast proliferation.

Five days after implantation, in the early placenta, the four layers composing the mink endotheliochorial placenta (allantochorionic, labyrinth, junctional and basal) are discernable. The labyrinth is composed of the chorionic villi, the foetal mesenchyme, and the fetal blood and maternal blood vessels, which are constituted of hypertrophied endothelial cells. Progranulin protein is present in high concentrations in the newly formed maternal hypertrophied endothelial cells (Fig. 5a, b). Further, progranulin immunoreactivity is observed in the cytotrophoblast cells composing the chorionic villi and

in the fetal capillaries of the mesenchymal core of the villi, but in the syncytiotrophoblast cells surrounding the cytotrophoblast, the signal is much weaker (Fig. 5a, b). In the elongated glands and the stromal cells from the junctional zone, progranulin has become less expressed (Fig. 5d, e), while in the intact glands from the basal glandular zone, progranulin is still present (Fig. 5d, e). This pattern of expression for progranulin protein suggests that progranulin is involved in the establishment of the labyrinth and in maternal as well as fetal angiogenesis in the mink placenta.

4.5 DISCUSSION

We used the mink model of endotheliochorial placentation to follow progranulin mRNA and protein expression pattern in pre- and early post-implantation events, and during early development of the placenta. This investigation provides the first evidence for the expression of progranulin in the trophoblast and the endometrium at the time of embryo implantation *in vivo*. Furthermore, the data obtained in this study suggest a new role for progranulin in the establishment of foetal villi and maternal and fetal vascular components in the endotheliochorial placenta of the mink.

4.5.1 Mink progranulin partial cDNA sequence

Herein we report the partial cDNA sequence for mink progranulin. Analysis of this fragment shows that exons 1 and 2 are highly conserved among mink, dogs, mice and humans. Exons 1 and 2 encode for 2 tandem cysteine-rich hemigranulin subdomains. Moreover, exons 1 and 2 are present in both isoforms, granulin/epithelin precursors 1 and 2, identified in rodents (Plowman *et al.*, 1992). Here we show that the mink progranulin

sequence for exons 1 and 2 share 86.6% identity with the human sequence, 82.4 % with the mouse sequence and 94.9% with the dog sequence. Thus, the mink progranulin sequence is more closely related to the human sequence than to the rodent sequence (GenBank accession numbers NM_002087 and NM_008175, respectively). The presence of the hemigranulin subdomains further suggests function of progranulin in mink parallels known functions in other species.

4.5.2 Progranulin and endometrial gland proliferation

During prolactin-mediated termination of embryonic diapause, progesterone is secreted by the corpus luteum and the consequent change in plasma progesterone concentration corresponds with a series of pre-implantation changes in the mink uterus (Moller, 1973). We show progranulin mRNA and protein to be expressed in the luminal and glandular endometrial epithelium following prolactin-mediated reactivation of the uterus and embryo. Moreover, the high expression of progranulin in the epithelial cells during the peri-implantation transformation, and its lower expression in the transformed glands of the post-implantation period suggest that progranulin is involved in the implantation-related epithelial cells transformations. In addition, the sustained strong expression of progranuline protein in the intact basal glands during all the stages examined suggests that progranuline is important for normal secretory activity of the endometrial glands.

4.5.3 Progranulin and cytotrophoblast proliferation

The present work followed the distribution of progranulin in the trophoblast on the day of implantation and through early postimplantation *in vivo*. Progranulin mRNA and protein expression are manifestly present in the mink cytotrophoblast during blastocyst adhesion and syncytiotrophoblast penetration into the endometrial epithelium, and this is consistent with the high levels of progranulin transcripts found previously in the mouse post-adhesion blastocyst by cDNA microarray (Qin *et al.*, 2003). Our data are also in accordance with the findings that progranulin promotes mouse trophoblast proliferation, as well as blastocyst hatching, adhesion and outgrowth in vitro (Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2005). In mustelid species, the cytotrophoblast undergoes active cell division soon after implantation to achieve formation of the chorionic villi (Enders A. C. & Schlafke, 1972). Here we show that progranulin expression remains elevated throughout chorionic villi development during early gestation in the mink. Thus, our results argue for a role for progranulin in cytotrophoblast proliferation and migration during formation of the chorionic villi throughout early implantation and placentation in the mink.

4.5.4 Progranulin and maternal endothelial cell proliferation

Winther et al. (Winther *et al.*, 1999) described the neovascularization of the mink placenta at different stages of development. During early gestation, maternal endothelial cells undergo extensive mitosis. At mid-gestation, the vessel walls are remodelling and periendothelial cells appear, and at late gestation, the mitogenic activity of these endothelial cells is decreased. According to our data, progranulin is differentially expressed in the

endothelial cells of the maternal blood vessels of the early implanted uterus, with stronger expression in the blood vessels nearby the transformed endometrial glands. These vessels are expected to be the newly formed blood vessels that will eventually irrigate the placental labyrinth. Our results reveal progranulin expression at high levels in the maternal hypertrophied endothelial cells of the incipient labyrinth. These results suggest that progranulin may play a role in angiogenesis, as has previously been reported in neovascularization during embryogenesis, tumorigenesis and throughout the wound repair process (He & Bateman, 2003). Progranulin is usually absent from normal adult endothelial cells, but during wound repair, its expression is strongly induced in the endothelial cells at the site of the lesion (He *et al.*, 2003). Moreover, progranulin promotes tubule-like structure formation of endothelial cells *in vitro* (He *et al.*, 2003), and enhance VEGF expression in breast cancer cells (Tangkeangsirisin & Serrero, 2004). Progranulin is also expressed in blood vessels surrounding invasive ovarian tumors (Jones M. B. *et al.*, 2003) and during establishment of the microvasculature in the murine embryo (Daniel *et al.*, 2003). We have previously shown that VEGF of embryo and stromal cell provenance to be strongly expressed during the implantation and early invasion in the mink (Lopes *et al.*, 2003). Together, the morphological evidence for expression in tissues at a time when extensive revascularization and VEGF expression is taking place supports a role for progranulin in neovascularization of the early placenta in the mink.

4.5.5 The regulation and the role of progranulin during implantation in the mink

Estrogen has previously been shown to stimulate the expression of progranulin in human breast cancer cells (Lu & Serrero, 1999), and progranulin was shown to mediate the

mitogenic effects of estrogen in these cells (Lu & Serrero, 2001), even in the absence of a typical estrogen response element (ERE) on the promoter of human and mouse progranulin gene (Baba *et al.*, 1993a, Bhandari *et al.*, 1996). In the rodent model displaying a facultative delay of implantation, estrogen, in combination with progesterone, is the signal that initiates blastocyst implantation (Psychoyos, 1973, Yoshinaga & Adams, 1966). Via the nuclear estrogenic receptor (ER), estrogens can induce the expression of many growth factors and their receptors in the mouse uterus during implantation by activating the membrane-trafficking pathway (Chen *et al.*, 1999). Moreover, early estrogenic responses can be observed in the presence of catechol-estrogen or xenoestrogens in the mouse uterus, independently of ER α / ER β (Das *et al.*, 1997a), suggesting that the activation of nongenomic pathways can be responsible of an estrogenic response in the uterus, independently of nuclear ERs. The roles of estrogen in mink during implantation are not clear, but based on this evidence, it would be reasonable to speculate that estrogen or other estrogenic compounds are potential regulators of progranulin expression in the mink endometrium and trophectoderm.

The pattern of progranulin expression and activity is, in many ways, similar to that of other growth factors in the blastocyst and the uterus. For example, around the time of embryo implantation in the mouse, several members of the EGF family of growth factors are upregulated in the uterus, including EGF itself, TGF α , HB-EGF, betacellulin, epiregulin, neuregulins and amphiregullin (Das *et al.*, 1997b, Lim *et al.*, 1998). The overlapping expression of several EGF family members in the endometrial epithelium around the time of implantation, and the absence of any defects in the implantation

phenotype in targeted mice for EGF/TGF α /amphiregulin in combination suggests that these growth factors play compensatory roles in the uterus (reviewed by (Dey *et al.*, 2004)). In addition, consistent with the effects of progranulin on mouse blastocysts (Diaz-Cueto *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2005), HB-EGF promotes development and hatching of human blastocysts in vitro (Martin *et al.*, 1998). Together, these findings suggest that the role of progranulin is redundant with the roles exerted by other similar growth factors during mink implantation. In summary, this report demonstrates the spatio-temporal distribution of progranulin mRNA and protein for the first time at the time of embryo implantation and early placenta development *in vivo*. Progranulin expression is mainly associated with epithelial hypertrophy and proliferation in the endometrium, with cytotrophoblast proliferation and migration, and with maternal angiogenesis in the endotheliochorial placenta. Therefore, we suggest that high levels of progranulin expression indicate that this protein plays a role in cell proliferation, remodeling and angiogenesis which occur during the establishment of the placenta in the mink.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the participation of Ricardo R. Guerra for its assistance with immunohistochemistry, Simon-Pierre Demers for the preparation of this manuscript, Mira Dobias-Goff for the technical support and Flavia L. Lopes for sample collection.

4.7 REFERENCES

- Baba T, Nemoto H, Watanabe K, Arai Y & Gerton GL 1993a Exon/intron organization of the gene encoding the mouse epithelin/granulin precursor (acrogranin). *FEBS Lett* 322 89-94.
- Baba T, Hoff HB, 3rd, Nemoto H, Lee H, Orth J, Arai Y & Gerton GL 1993b Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. *Mol Reprod Dev* 34 233-243.
- Backlin BM, Persson E, Jones CJ & Dantzer V 1998 Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure produces placental vascular and trophoblastic lesions in the mink (*Mustela vison*): a light and electron microscopic study. *Apmis* 106 785-799.
- Bateman A & Bennett HP 1998 Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* 158 145-151.
- Bhandari V & Bateman A 1992 Structure and chromosomal location of the human granulin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 188 57-63.
- Bhandari V, Palfree RG & Bateman A 1992 Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 1715-1719.
- Bhandari V, Giaid A & Bateman A 1993 The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. *Endocrinology* 133 2682-2689.

- Bhandari V, Daniel R, Lim PS & Bateman A 1996 Structural and functional analysis of a promoter of the human granulin/epithelin gene. *Biochem J* 319 (2) 441-447.
- Chen D, Ganapathy P, Zhu LJ, Xu X, Li Q, Bagchi IC & Bagchi MK 1999 Potential regulation of membrane trafficking by estrogen receptor alpha via induction of rab11 in uterine glands during implantation. *Mol Endocrinol* 13 993-1004.
- Daniel R, Daniels E, He Z & Bateman A 2003 Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev Dyn* 227 593-599.
- Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J & Bateman A 2000 Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 48 999-1009.
- Das SK, Taylor JA, Korach KS, Paria BC, Dey SK & Lubahn DB 1997a Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 12786-12791.
- Das SK, Das N, Wang J, Lim H, Schryver B, Plowman GD & Dey SK 1997b Expression of betacellulin and epiregulin genes in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the "window" of implantation. *Dev Biol* 190 178-190.
- Desmarais JA, Bordignon V, Lopes FL, Smith LC & Murphy BD 2004 The escape of the mink embryo from obligate diapause. *Biol Reprod* 70 662-670.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T & Wang H 2004 Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25 341-373.

- Diaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM & Gerton GL 2000 Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol* 217 406-418.
- Donald CD, Laddu A, Chandham P, Lim SD, Cohen C, Amin M, Gerton GL, Marshall FF & Petros JA 2001 Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. *Anticancer Res* 21 3739-3742.
- Duby RT & Travis HF 1972 Photoperiodic control of fur growth and reproduction in the mink (*Mustela vison*). *J Exp Zool* 182 217-226.
- Enders AC & Schlafke S 1972 Implantation in the ferret: epithelial penetration. *Am J Anat* 133 291-315.
- Enders AC & Mead RA 1996 Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the western spotted skunk. *Anat Rec* 244 297-315.
- Enders RK 1952 Reproduction in the mink (*Mustela vison*). *Proc. Am. Phil. Soc.* 96 691-755.
- Gulamhusein AP & Beck F 1973 Light and electron microscope observations at the pre- and early post-implantation stages in the ferret uterus. *J Anat* 115 159-174.
- Gulamhusein AP & Beck F 1975 Development and structure of the extra-embryonic membranes of the ferret. A light microscopic and ultrastructural study. *J Anat* 120 349-365.
- Hansson A 1947 The physiology of reproduction in the mink (*Mustela vison* Schreb.) with special reference to delayed implantation. *Acta Zool* 28 1-136.

- He Z & Bateman A 2003 Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med* 81 600-612.
- He Z, Ong CH, Halper J & Bateman A 2003 Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 9 225-229.
- He Z, Ismail A, Kriazhev L, Sadvakassova G & Bateman A 2002 Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Res* 62 5590-5596.
- Hrabal R, Chen Z, James S, Bennett HP & Ni F 1996 The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nat Struct Biol* 3 747-752.
- Jones CJ, Dantzer V, Leiser R, Krebs C & Stoddart RW 1997 Localisation of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial, and haemomonochorial placentation. *Microsc Res Tech* 38 100-114.
- Jones MB, Michener CM, Blanchette JO, Kuznetsov VA, Raffeld M, Serrero G, Emmert-Buck MR, Petricoin EF, Krizman DB, Liotta LA *et al.* 2003 The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9 44-51.
- Krebs C, Winther H, Dantzer V & Leiser R 1997 Vascular interrelationships of near-term mink placenta: light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts. *Microsc Res Tech* 38 125-136.

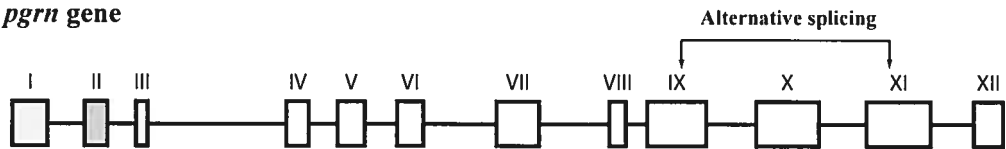
- Liau LM, Lallone RL, Seitz RS, Buznikov A, Gregg JP, Kornblum HI, Nelson SF & Bronstein JM 2000 Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res* 60 1353-1360.
- Lim H, Das SK & Dey SK 1998 erbB genes in the mouse uterus: cell-specific signaling by epidermal growth factor (EGF) family of growth factors during implantation. *Dev Biol* 204 97-110.
- Lopes FL, Desmarais JA & Murphy BD 2004 Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* 128 669-678.
- Lopes FL, Desmarais J, Gevry NY, Ledoux S & Murphy BD 2003 Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 68 1926-1933.
- Lu R & Serrero G 1999 Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256 204-207.
- Lu R & Serrero G 2001 Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 142-147.
- Martin KL, Barlow DH & Sargent IL 1998 Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 13 1645-1652.
- Martinet L, Allais C & Allain D 1981 The role of prolactin and LH in luteal function and blastocyst growth in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil Suppl* 29 119-130.

- Moller OM 1973 The progesterone concentrations in the peripheral plasma of the mink (*Mustela vison*) during pregnancy. *J Endocrinol* 56 121-132.
- Murphy BD & James DA 1974 The effects of light and sympathetic innervation to the head on nidation in mink. *J Exp Zool* 187 267-276.
- Murphy BD, Mead RA & McKibbin PE 1983 Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink. *Biol Reprod* 28 497-503.
- Murphy BD, Concannon PW, Travis HF & Hansel W 1981 Prolactin: the hypophyseal factor that terminates embryonic diapause in mink. *Biol Reprod* 25 487-491.
- Papke RL, Concannon PW, Travis HF & Hansel W 1980 Control of luteal function and implantation in the mink by prolactin. *J Anim Sci* 50 1102-1107.
- Plowman GD, Green JM, Neubauer MG, Buckley SD, McDonald VL, Todaro GJ & Shoyab M 1992 The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem* 267 13073-13078.
- Psychoyos A 1973 Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 31 201-256.
- Qin J, Takahashi Y, Imai M, Yamamoto S, Takakura K, Noda Y & Imakawa K 2003 Use of DNA array to screen blastocyst genes potentially involved in the process of murine implantation. *J Reprod Dev* 49 473-484.
- Qin J, Diaz-Cueto L, Schwarze JE, Takahashi Y, Imai M, Isuzugawa K, Yamamoto S, Chang KT, Gerton GL & Imakawa K 2005 Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse. *Biol Reprod* 73 434-442.

- Steven DH 1975 Anatomy of the placental barrier. In *Comparative placentation: Essays in structure and function.*, pp 25-57, Eds RJ Harrison & AW Asscher. New York: Academic Press.
- Sundqvist C, Ellis LC & Bartke A 1988 Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocr Rev* 9 247-266.
- Suzuki M & Nishihara M 2002 Granulin precursor gene: a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genet Metab* 75 31-37.
- Tangkeangsirisin W & Serrero G 2004 PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 25 1587-1592.
- Tangkeangsirisin W, Hayashi J & Serrero G 2004 PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* 64 1737-1743.
- Winther H, Leiser R, Pfarrer C & Dantzer V 1999 Localization of micro- and intermediate filaments in non-pregnant uterus and placenta of the mink suggests involvement of maternal endothelial cells and periendothelial cells in blood flow regulation. *Anat Embryol (Berl)* 200 253-263.
- Yoshinaga K & Adams CE 1966 Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil* 12 593-595.
- Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH & Baserga R 1999 Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res* 59 5331-5340.

Zhou J, Gao G, Crabb JW & Serrero G 1993 Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem* 268 10863-10869.

pgrn gene



		10	20	30	40	50	
HUMAN	>	1	ATGTGGACCC	TGGTGAGCTG	GGTGGCCTTA	ACAGCAGGGC	TGGTGGCTGG
MOUSE	>	1	ATGTGGGTCC	TGATGAGCTG	GCTGGCCTTC	GCGGCAGGGC	TGGTAGCCGG
DOG	>	1	ATGTGGACCC	TGGTGAGCTG	GGTGGCCTTG	GTTGGCCGGC	TGGTAGCTGG
MINK	>	-62
Consensus		1	ATGTGGRYCC	TGRTGAGCTG	GSTGGCCTTV	RYRGCMSGGC	TGGTRGCGG
		60	70	80	90	100	
HUMAN	>	51	AACGCGGTGC	CCAGATGGTC	AGTTCTGCCC	TGTGGCCTGC	TGCCTGGACC
MOUSE	>	51	AACACAGTGT	CCAGATGGGC	AGTTCTGCCC	TGTGGCCTGC	TGCCTTGACC
DOG	>	51	GACACAGTGC	CCAGATGGTC	AGTTCTGCCC	TGTGGCCTGC	TGCCTGGACC
MINK	>	-12AGATGGTA	AGTTCTGCCC	TGTGGCCTGC	TGCCTGGACC
Consensus		51	RACRCRGTGY	CCAGATGGKM	AGTTCTGCCC	TGTGGCCTGC	TGCCTKGACC
		110	120	130	140	150	
HUMAN	>	101	CCGG?AGGAG	CCAGCTACAG	CTGCTGCCGT	CCC?CTT?CT	GGACAAATGG
MOUSE	>	101	?AGGGAGGAG	CCAAGTACAG	CTGCTGTAA?	CCCTCTT?CT	GGACACATGG
DOG	>	101	CAGGA?GGAG	CCAGCTACAG	TTGCTGCAAT	CCCA?TT?CC	GGGCAAGTGG
MINK	>	39	CAGGA?GGAG	CGAGCTACAG	TTGCTGCCAT	CC?TG?TTCC	GGGCCAGTGG
Consensus		101	CMGGRAGGAG	CSARCTACAG	YTGCTGYMRT	CCCWSTTTTCY	GGRCMRTGG
		160	170	180	190	200	
HUMAN	>	151	CCCACAACA?	CTGAGC??AG	GCATCTGGG?	?T?GGCC?CC	TGCCAG??GT
MOUSE	>	151	CCTAGAATAA	C?GAGCCAT?	?CATCTAG??	AT?GG?CTCC	TGCCAGACCC
DOG	>	151	CCCACGG?AG	CTGAGC?A?G	GCATCTGGG?	C?AGGCC?C?	TGCCAG?C?T
MINK	>	89	CCCACAGT?G	CTGAGC?A?G	GCAGCTGGGG	?C?G?CC?CC	TGCC?GG?GT
Consensus		151	CCYASRRYAR	CTGAGCCAWG	GCAKCTRGGG	MYAGCCCTCC	TGCCAGRCSY
		210	220	230	240	250	
HUMAN	>	201	TGATGCCAC	TG?CTCTGCC	?GGCCACTCC	TGCATCTTTA	CCG??TCTCA
MOUSE	>	201	??ATGGCCAC	TGTC?CTGC?	TGGCTATTCT	TGTCCTCTCA	CTGTGCT?G
DOG	>	201	AGATGCCAC	TGC?TCT?CC	TGGCTACTCC	TGCCTCCTCA	C?GA?TCTTG
MINK	>	139	AGATGCCAC	TGC?TCT?CC	TGGCTACTCC	TGCCTCCTCA	CCGTCTCT?G
Consensus		201	WGATGCCAC	TGYCTCTGCC	TGGCYAYTCY	TGYMTYYTYA	CYGWSTCTYR
		260	270	280	290	300	
HUMAN	>	251	GGGACTTCCA	GTTGCTGCCC	CTTCCC?AGA	GACAG?GCCG	TG?GC??ATG
MOUSE	>	251	GG?ACTTCCA	GCTGCTGCCC	GTTCTCTA?A	GGGTGTGTCT	TGTGGTGATG
DOG	>	251	GGGACCTCCA	GCTGCTGCCC	GTTCCCA?GA	GGCCGTGT?G	TGTGCCGATG
MINK	>	189	GG?ACCTCCA	GCTGCTGCCC	GTTCCCA?GA	GGCCGTGT?G	TGT.....
Consensus		251	GGGACTTCCA	GTTGCTGCCC	STTCYCWAGA	GRSHGTGYCK	TGTGSYGATG
		310	320	330	340	350	
HUMAN	>	301	?CGGGGATGG	CCATCACTGC	TGCCCCACGG	GCTTCCACTG	CAGTGCAGAC
MOUSE	>	301	GCT??A???	CCA?C??TGC	TGCCCCCAGG	GCTTCCACTG	TAGTGCAGAT
DOG	>	301	GCCGCCA???	C??T???	TGCCCCACGAG	GCTACCCTG	CAGTGTCTGAT
MINK	>	239
Consensus		301	GCBGSSATGG	CCATCACTGC	TGCCCMCRRG	GCTWCCACTG	YAGTGCWAGY
		360	370	380	390	400	
HUMAN	>	351	GGGCGATCCT	GCTTCCAAA?	GATCAG....
MOUSE	>	351	GGGAAATCCT	GCTTCCAGAT	G?TCAGATAA	C.....
DOG	>	351	GGGAGGTCCT	GCTTCCAAAG	?ATCAGGTG?	CG.....
MINK	>	289
Consensus		351	GGGMRRTCCT	GCTTCCARAK	GATCAGRTRA	CG.....

Figure 4.1 Partial cDNA sequence of mink progranulin, and homology between human, canine, mouse and mink progranulin sequences. Upper panel: The human progranulin gene contains 12 exons (boxes I to XII). An alternative transcript (isoform 2) can be generated, which lacks 465 bp encompassing a part of exon 9, all of exon 10 and a part of exon 11 (arrows), resulting in a hybrid granulin/epithelin domain. Lower panel: In homology with the human progranulin gene sequence, the mink partial cDNA sequence for progranulin spans exons 1-3 (light and dark grey boxes), and encompasses 214 bp. This region contains two granulin/epithelin hemidomains of progranulin, and its sequence is highly conserved among human, dog, mouse and mink species. The mink sequence shares 86.6% identity with the human, 82.4% with the mouse and 94.9% with the dog.

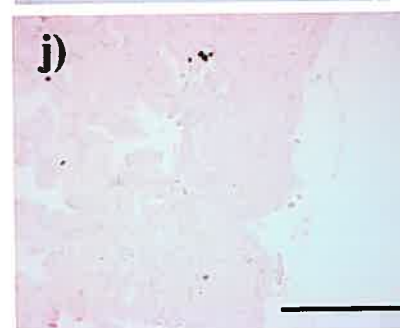
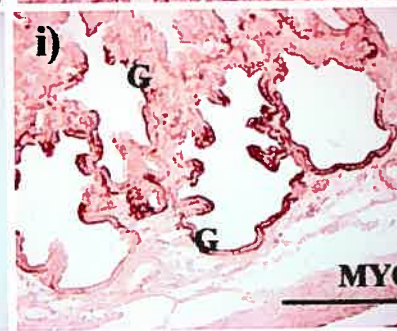
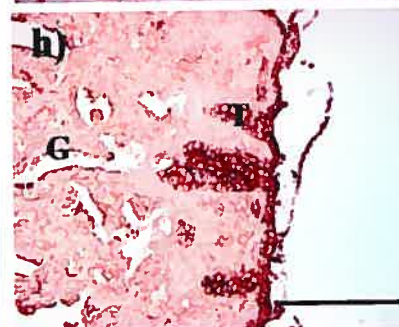
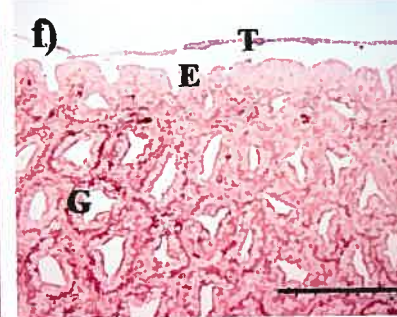
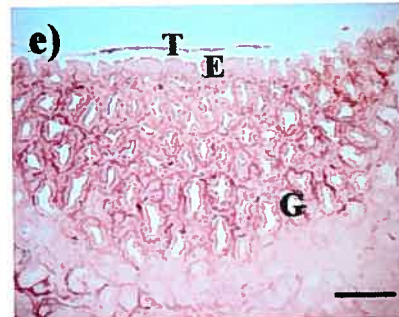
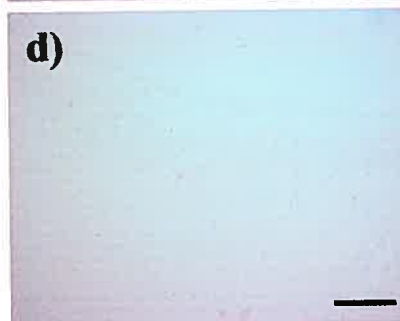
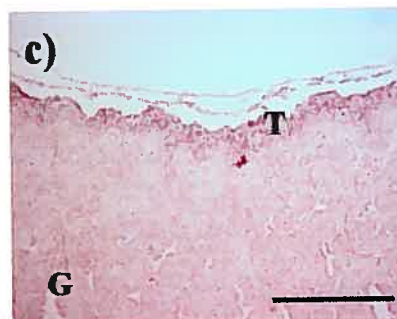
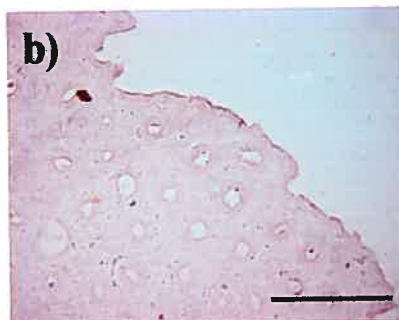
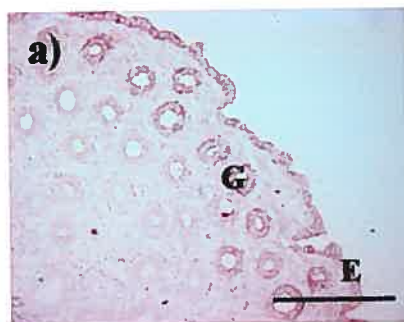


Figure 4.2 Progranulin mRNA is expressed in mink trophoblast and endometrium around the time of embryo implantation. In situ hybridization was performed with anti-sense (**a, c, e, f, h, i**), or sense (control) (**b, d, g, j**) probe for progranulin mRNA. (**a, b**) Prolactin-activated mink uterus, before implantation occurs. There is pronounced mRNA expression in luminal and glandular endometrial epithelium. (**c, d**) Early implanted stage uterus. Strong expression of progranulin transcript is observed in the trophoblast cells. (**e, f, g**) Early implanted stage uterus, during trophoblast apposition. Progranulin transcript is strongly induced in glandular epithelium undergoing transformation (**e**), and the cytoplasmic localisation of progranulin transcript in the glandular epithelium and in the stroma can be appreciated at a higher magnification (**f**). (**h, i, j**) During villi formation in the incipient labyrinth, progranulin hybridization signal is most intense in cytotrophoblast cells of the embryo (**h**). There is also a positive signal in the transformed and basal endometrial glands (**i**). **E:** Luminal epithelium; **G:** glandular epithelium; **T:** trophoblast; **MYO:** myometrium. Bars: 200 μm .

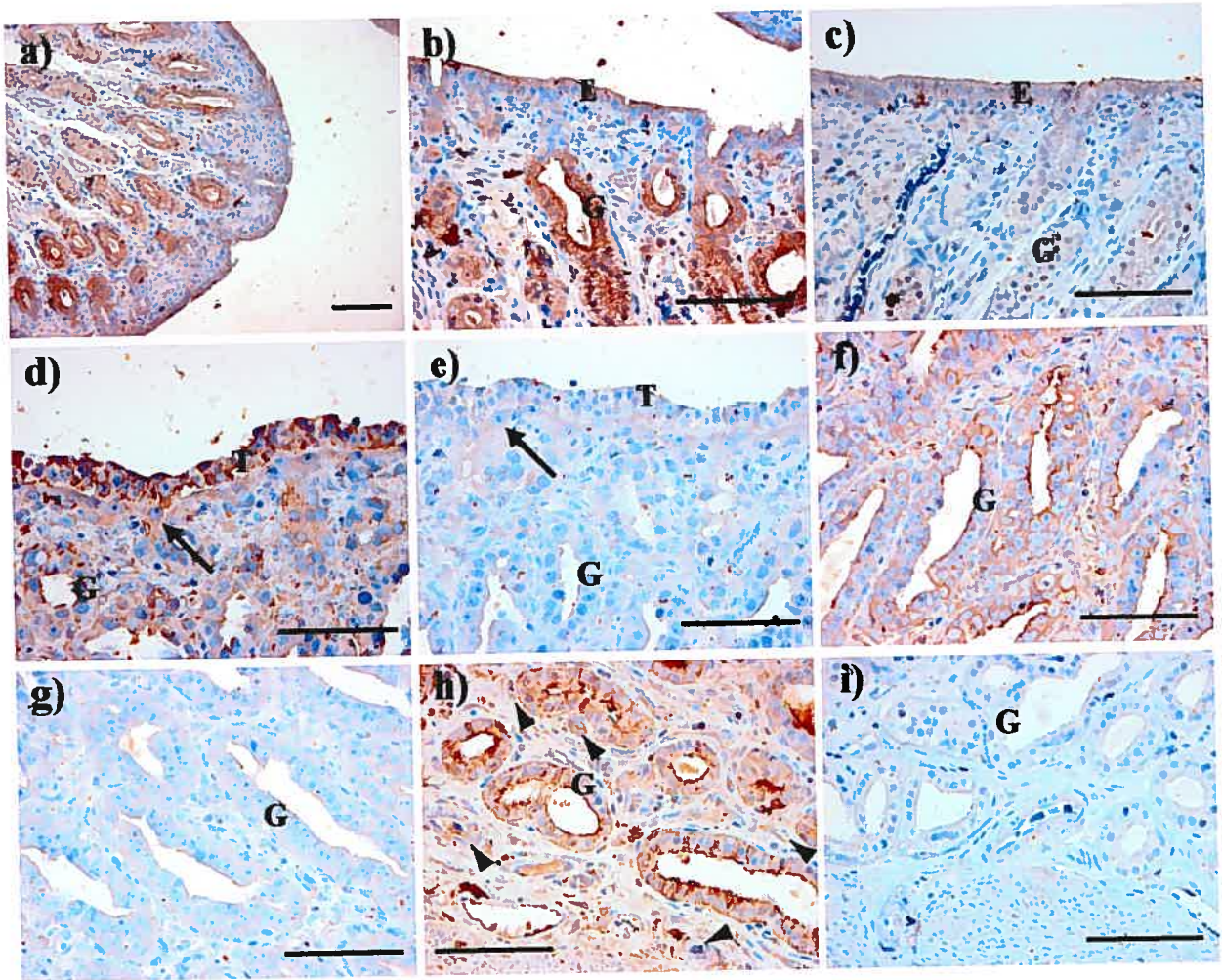


Figure 4.3 Progranulin protein is expressed in the trophoblast and endometrial cells in the mink pre-implantation and early implanted uterus. To detect progranulin protein by immunohistochemistry, immune rabbit serum against human progranulin (**a, b, d, f, h**), or pre-immune rabbit serum (control) (**c, e, g, i**) were employed. (**a, b, c**) In the prolactin-activated mink uterus, progranulin protein is present in the endometrial glands (**a**), and at higher magnification (**b**), we can detect the presence of progranulin protein in the cytoplasm of the luminal epithelium. (**d, e, f, g, h, i**) Early implantation sites. Progranulin protein was detected in the trophoblast, including the cytotrophoblast and the syncytiotrophoblast (**d**), in the transforming glandular epithelium and surrounding stroma (**f**), as well as in the intact basal glands and in the maternal blood vessels, at different intensities (**h**). **E**: Luminal epithelium; **G**: glandular epithelium; **T**: trophoblast; arrow: syncytiotrophoblast; arrowheads: maternal blood vessels. Bars: 100 μm .

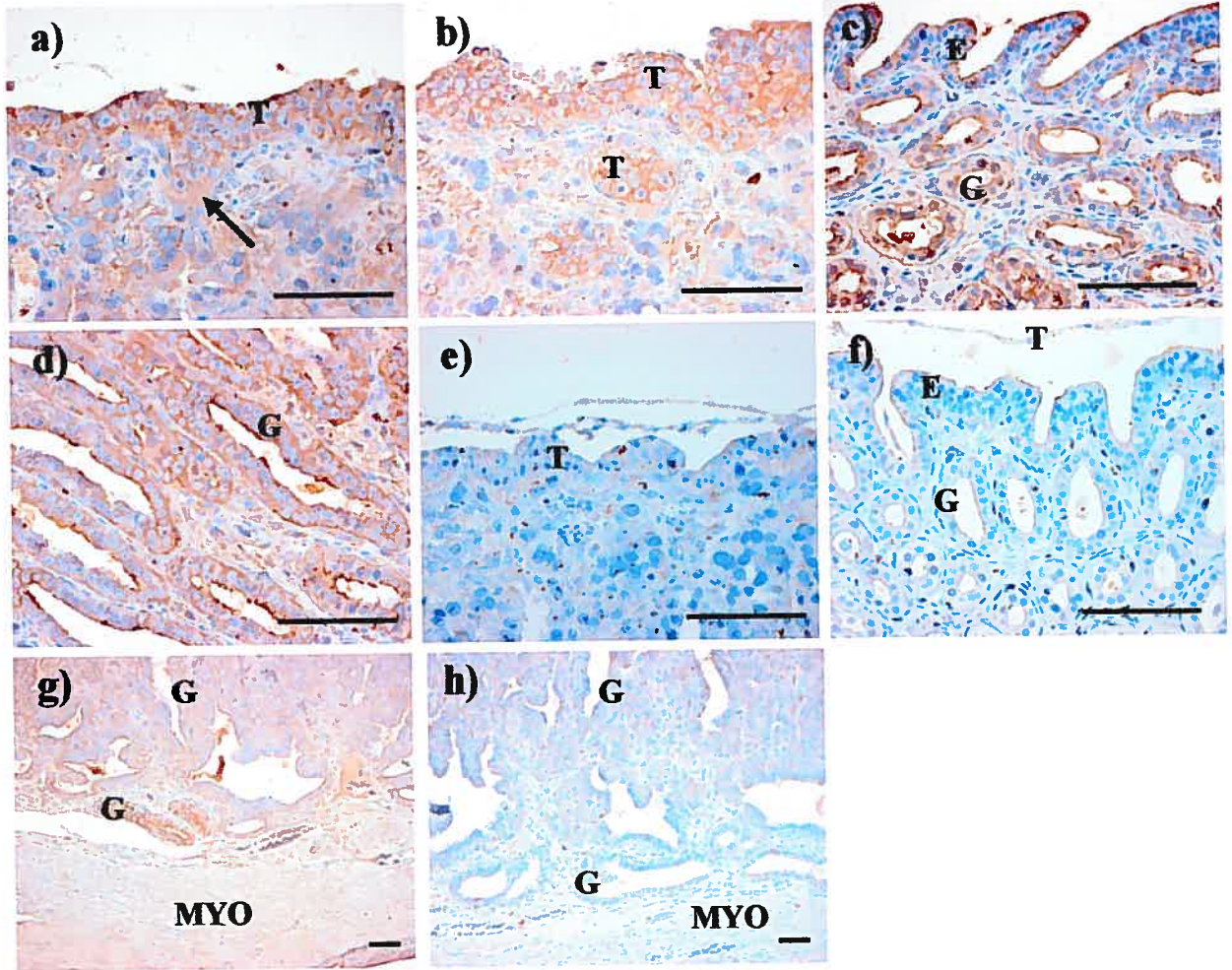


Figure 4.4 Progranulin protein localizes in the mink endometrium and trophoblast

during the early post-implantation period. To detect progranulin protein by immunohistochemistry, either rabbit serum against human progranulin (**a, b, c, d, g**), or pre-immune rabbit serum (control) (**e, f, h**) were employed. (**a, e**) In the implantation site, 1 day after implantation, progranulin protein is detected in the cytotrophoblast and in the syncytiotrophoblast invading the maternal endometrium. (**b, c, d, f, g, h**) The implantation site, 2 days after implantation, when the trophoblast initiates chorionic villi formation. An immunopositive signal indicating the presence of progranulin in the trophoblast (**b**), in the luminal epithelium, and in the glandular epithelium of rounded (**c**), or elongated (**d**) glands. The signal is also present in the intact basal glands at the implantation site (**g**) and in the stroma (**d**). **E**: Luminal epithelium; **G**: glandular epithelium; **T**: trophoblast; **MYO**: myometrium; arrow: syncytiotrophoblast. Bars: 100 μ m.

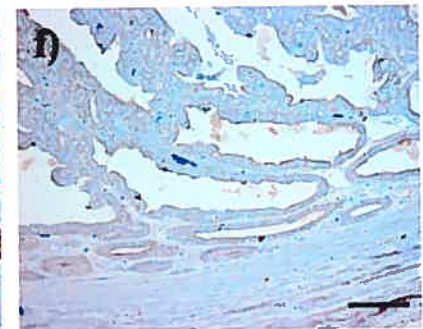
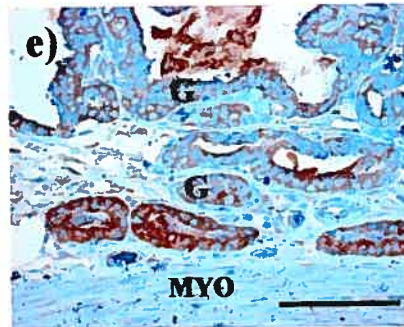
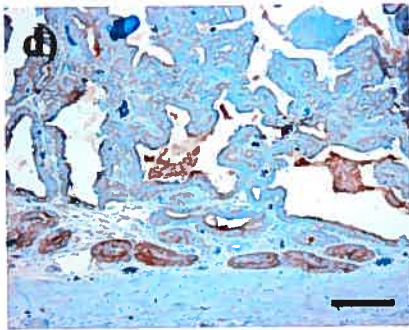
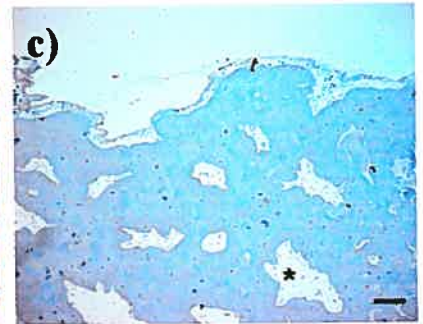
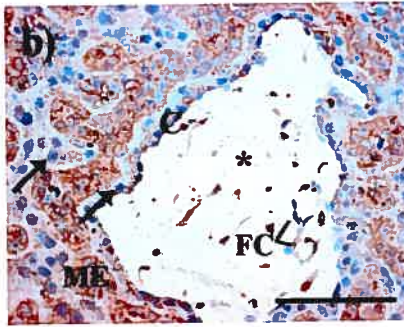
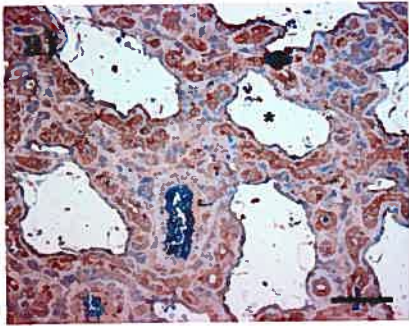


Figure 4.5 Progranulin protein is expressed in the trophoblast and the maternal hypertrophied endothelial cells in the early mink placenta. To detect progranulin protein by immunohistochemistry, the immune rabbit serum against human progranulin (**a, b, d, e**), or the pre-immune rabbit serum (control) (**c, f**) were employed. (**a, b, c**) Labyrinth of the early mink placenta (at day 5 following implantation). High expression of progranulin protein is detected in many cell types of the labyrinth (**a**). It is present in the cytotrophoblast and the syncytiotrophoblast, and highly expressed in the fetal capillaries of the mesenchymal chore and in the maternal hypertrophied endothelial cells surrounding the foetal villi, as shown at higher magnification (**b**). (**d, e, f**) Glandular zone of the early mink placenta. The immunostaining is strongly positive in the intact basal glands, and somewhat weaker in the epithelium of the transformed glands (**d, e**). **E**: luminal epithelium; **G**: glandular epithelium; **C**: cytotrophoblast; **MYO**: myometrium; **ME**: maternal endothelial cells (maternal blood vessels); * Chorionic villi, comprising the foetal mesenchyme and fetal capillaries (**FC**), the cytotrophoblast and the syncytiotrophoblast; arrows: Syncytiotrophoblast: Bars: 100 μm .

5.0 ARTICLE TROISIÈME

**The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
Regulates Trophoblast Cell Differentiation in Mink
(*Mustela vison*)**

Joëlle A. Desmarais¹, Flavia L. Lopes¹, Hao Zhang², Sanjoy K. Das² and Bruce D.
Murphy^{1,3}

Addresses

¹Centre de recherche en reproduction animale, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6 and ²Department of Pediatrics, The Division of Reproductive and Developmental Biology, Vanderbilt University, D-4100 Medical Center North, Nashville 37232, TN, USA.

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Bruce D. Murphy. J.A.D., F.L.L., H.Z, S.K.D., and B.D.M. have no real or potential conflicts of interest to declare with entities related to the material being published.

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Regulates Trophoblast Cell Differentiation in Mink (*Mustela vison*)

Joëlle A. Desmarais¹, Flavia L. Lopes¹, Hao Zhang², Sanjoy K. Das² and Bruce D. Murphy^{1,3}

Addresses

¹Centre de recherche en reproduction animale, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6 and ²Department of Pediatrics, The Division of Reproductive and Developmental Biology, Vanderbilt University, D-4100 Medical Center North, Nashville 37232, TN, USA.

Key words

Trophoblast, embryo, implantation, PPARG, endotheliochorial placenta

Short title

PPARG regulates trophoblast differentiation

³Corresponding Author (to whom reprints should be addressed):

tel : 450-773-8521 ext 18627, fax : 450-778-8103.

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Bruce D. Murphy. J.A.D., F.L.L., H.Z., S.K.D., and B.D.M. have no real or potential conflicts of interest to declare with entities related to the material being published.

5.1 ABSTRACT

Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family are implicated in implantation and early placental formation. In carnivores, the trophoblast invades to develop intimate contact with the endothelial cells of the maternal circulation, resulting in an endothelio-chorial form of placentation. Spatio-temporal investigation demonstrated that peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) was strongly and specifically expressed in the mink trophoblast at the time of formation of the syncytiotrophoblast during early implantation, and in trophoblast of the placental labyrinth. The retinoid-X-receptor alpha (RXRA), the heterodimeric partner of PPARG in transcriptional regulation, is, with very few exceptions, co-expressed with PPARG in mink trophoblast. We used mink trophoblast cell lines together with a natural (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2) or a synthetic (troglitazone) PPARG ligand to demonstrate that PPARG is an authentic regulator of gene expression in this tissue. Ligand-activated PPARG stimulated transcription of the PPRE-luc reporter gene transfected into these cell lines. The prostaglandin-induced morphological changes were accompanied by attenuation in cell proliferation, an increase in *PPARG* mRNA and protein levels, and the appearance of enlarged and multinuclear cells. Furthermore, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 stimulated the expression of invasion-related genes in trophoblast cells, namely adipophilin and osteopontin. The results demonstrate that PPARG ligands attenuate proliferation and induce differentiation of mink trophoblast cells to the multinuclear phenotype. The upregulation of differentiation-specific genes in the placenta under the influence of PPARG

ligands provides a mechanism by which blastocyst and endometrial prostanoids regulate implantation, as well as the formation and maintenance of the placenta.

5.2 INTRODUCTION

The formation of the diverse types of mammalian placenta is a function of the invasiveness of the trophoblast and its capacity to degrade and eliminate the tissue barriers between itself and the maternal vascular elements of the endometrium. In carnivores, the trophoblast invades to develop intimate contact with the endothelial cells of the maternal circulation, resulting in an endothelio-chorial form of placentation [1]. Morphological analysis of the early stages of implantation and placental formation in two mustelid carnivores, the ferret (*Mustela putorius*) [2] and the spotted skunk (*Spilogale gracilis*) [3] indicates that the trophoblast cells of the chorion proliferate and expand rapidly prior to direct association with the maternal epithelium. These changes are accompanied by enlargement of some trophoblast cells and the initial formation of structures known as syncytial plaques with the result that, as implantation approaches, the trophoblast is bilaminar, comprising inner cytotrophoblast and outer syncytial trophoblast layers [2, 4]. These plaques attach to the endometrial epithelium and form the trophoblastic villi that penetrate into the epithelium via the necks of the endometrial glands, inducing formation of maternal symplasma from glandular epithelial cells [5]. From thence, as illustrated by the spotted skunk, the syncytial trophoblast surrounds the maternal capillary plexus, and fetal vessels form within the mesenchyme adjacent to the cytotrophoblast [4]. According to Enders [6], four distinct layers compose the mink placenta. The exchange function of the placenta occurs in the allantochorionic and the labyrinth zones. The third layer is the

invasion front, comprising the maternal cell debris, given the name junctional zone, and the more distal maternal remains of the endometrium are referred as the glandular zone.

Recently, nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family have been implicated in the processes of implantation and early placental formation. These receptors serve as transcription factors, forming functional heterodimers with another nuclear receptor, the retinoid-X receptor- α (RXRA) [7]. Ablation of the *PPARG* gene in mice resulted in fetal loss at embryonic day 10.5 [8, 9], attributed to defects in formation of the placenta [8]. Phenotypic analysis of these null mice revealed that PPARG is essential for the proper development of the labyrinth layer of the placenta, and for the establishment of proper maternal vascularity within the labyrinth [8]. Further, the disruption of the *RXRA* gene in mice resulted in abnormalities of the labyrinthine and spongiotrophoblast layers of the placenta, leading to embryonic lethality and consistent with the PPARG knockout phenotype [10]. PPARG plays an important role in cell differentiation in other tissues, best exemplified by its ability to induce adipogenesis and adipocyte differentiation [8, 11].

We have previously shown the presence of prostaglandin synthetic enzymes associated with embryo implantation in mink [12], and, more recently demonstrated prostaglandin regulation of vascular endothelial growth factor transcription in mink uterine cells [13]. The prostaglandins can act through their G-coupled membrane-bound receptor, or through nuclear receptors. The bioactive metabolite of prostaglandin D₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂), is a natural ligand for PPARG [14, 15]. In addition, there are numerous synthetic ligands for PPARG, the most potent being the

thiazolidinediones (TZD), a family of antidiabetic drugs [15, 16]. As PPARG ligands attenuate cell proliferation and induce cell differentiation, and the anti-oncogenic action of these ligands has attracted great interest [17].

The molecular pathways involved in trophoblast differentiation are not well elaborated for any of the mammalian placental subtypes, and virtually nothing is known about the endotheliochorial placenta. Further, the role of PPARG in trophoblast differentiation has not been extensively investigated in the context of implantation. Here we use the mink model to investigate PPARG function in the carnivore endotheliochorial type of placenta. We report the first evidence for an early expression of PPARG associated to trophoblast attachment and implantation. In addition, we will present data supporting a role for PPARG in syncytiotrophoblast differentiation.

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 Animals and Sampling

All procedures involving live animals were approved by the Comité de déontologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, accredited by the Canadian Council on Animal Care. Ranch mink of the Dark and Pastel varieties were purchased from Armand Richard, (St.Damase, QC, Canada), and were bred during the mating season to two fertile males according to the usual farming procedures. To terminate embryonic diapause and induce implantation, we used a treatment regime that we have previously employed [18] in which animals were injected intramuscularly with ovine prolactin, 1 mg kg⁻¹ day⁻¹ (Sigma, St-Louis, MO), after the 21 March, for a maximum of 11 days. Embryos

were collected by uterine flushing with TC-199 medium (Gibco, Burlington, ON, Canada), containing 10 % fetal bovine serum (Gibco). Uterine horns were dissected separately and one was fixed in 4 % paraformaldehyde (Sigma) overnight for immunohistochemistry, while the other was flash frozen in liquid nitrogen for subsequent RNA extraction or in situ hybridization.

5.3.2 RNA probes and in situ hybridization

To generate the RNA anti-sense probes for in situ hybridization, RT-PCR using a mink uterine tissue was performed with the forward primer 5- CTT GAC AGG AAA GAC AAC AGA C-3 and the reverse primer 5-CAG CAA ACT CAA ACT TGG GTT C -3 to obtain a 705 bp *PPARG* fragment. To amplify the 450bp *RXR α* fragment, the forward primer used was 5-TGA TCG ACA AGC GGC AGC GGA AC-3, and the reverse primer was 5-GGA GAA GGA GGC GAT GAG CAG C -3. PCR products were subcloned into a pDrive cloning vector (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), and amplified in competent bacteria of XL1-Blue strain, displaying flanking Sp6 and a T7 RNA polymerase recognition sites for the generation of ³⁵S-CTP labelled RNA probes.

In situ hybridization using *PPARG*, and *RXR α* anti-sense or sense (control) RNA probes was achieved as described in [19]. Briefly, cryostat sections (11 μ m), mounted on poly-lysine-coated slides, were post-fixed in 4 % paraformaldehyde and washed in PBS. Following a pre-hybridization step, hybridization of the anti-sense probe continued for 4 h at 45°C. Sections were washed and incubated with 20 μ g ml⁻¹ RNase A for 20 min at 37°C

to eliminate excess probe. The positive signal was revealed by autoradiography using NTB-2 liquid emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY).

5.3.3 Immunohistochemistry

Fixed uterine tissues were embedded in paraffin and sectioned at 4 μm . Immunohistochemistry employed 1:50 PPAR γ (H-100) and 1:75 RXRA (D-20) rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and biotinylated anti-rabbit IgG second antibody (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Vector Laboratories, Burlingame, CA), following the protocol described in Lord et al. [20]. Briefly, paraffin sections were dehydrated in ethanol, washed in TBS, and the endogenous peroxidase was inactivated by incubation in 3 % peroxide in methanol. Antigen was retrieved by brief incubation of the sections in boiling 0.1 M citrate buffer (pH 6.0). Non-specific primary antibody binding activity was blocked with normal goat serum (10 % in TBS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), and the tissues were incubated overnight with the first antibody at 4°C in a humid, dark slide chamber. After repeated washes, sections were incubated with biotinylated second antibody for 2 h at room temperature, and the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) with the Vector NovaRED substrate kit (Vector Laboratories) were used to detect the peroxidase activity. Negative control sections were submitted to the same procedures, except that the first antibody was replaced by 10 % normal goat serum in TBS.

We performed single or double fluorescence immunolabeling on trophoblast cells in culture, as described by [21]. The anti-osteopontin monoclonal antibody MPIIB10₁ was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices

of the NICHD, and maintained by the University of Iowa, (Iowa City, IA). In brief, the cells were grown on a coverslip in a 4 well dish, fixed with cold methanol (-20°C), and washed with PBS. Non-specific antibody binding was blocked over 2 h incubation with 0.1 % Triton X-100 (Sigma) in PBS. Cells were incubated overnight with the anti-osteopontin antibody (1:50) and with the anti-PPARG antibody (1:100). Following a wash with 0.1 % Triton in PBS for 2 h, the second antibodies were added at a concentration of 1:1000 for CY3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) and 1 :25 for fluorescein (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG, (Jackson ImmunoResearch). The cells were incubated with diamidino-4'6-phenylindol-2 dichlorhydrate (DAPI), and washed in PBS before the coverslips were mounted on slides with DABCO antifade mounting medium (2.5 % (w/v) 1,4-diazabicyclo(2,2,2) octane (Sigma), 50mM Tris-HCl pH 8,0, 90 % glycerol). For negative control, the primary antibody was replaced by the blocking buffer. All steps were carried out at 4°C. The signal was visualized by fluorescence microscopy (Leica ASLMD microscope, Leica Cambridge, UK), with a mercury lamp (HBO 103 W/2, LEJ, Jena, Germany). The micrographs were acquired with the Leica DC500 camera and a DFC Twain Software (Leica).

5.3.4 Trophoblast cell culture and treatments

Trophoblast cell culture was established as previously described [22] with some modifications. The embryo was placed in culture with a mouse fetal fibroblast feeder monolayer and mouse trophoblast stem cell medium (TS) with 20 % fetal bovine serum, containing 25 ng ml⁻¹ of fibroblast growth factor (FGF4, Sigma) and 1 µg ml⁻¹ heparin

(Sigma) as described in [23]. When the blastocyst was attached to the monolayer and the trophoblast had begun to proliferate, the ICM was removed with a glass pipette. At confluence, cells were passaged to a gelatin- and poly-lysine- coated Petri dish or 6-well plate, free of the monolayer, and conditioned media was used thereafter for continuous culture as described in [23]. Medium was changed at 2 day intervals, and cells were passaged at confluence (approximately 7 day intervals) by pipetting. A stock of the trophoblast cells was conserved at -80°C and thawed as needed.

To verify the trophoblastic provenience and nature of the cells, mink primers were designed using a multispecies comparative approach, for a series of trophoblast marker genes [24, 25]. Subsequent RT-PCR analysis (Fig. 1) demonstrated that the putative trophoblast cells to be positive for the mink orthologs of the trophoblast markers, caudal type homeobox transcription factor 2 (*CDX2*, GenBank AY460115), eomesodermin (*EOMES*, GenBank AY460116), fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*, GenBank AY460117), heart- and neural crest derivatives-expressed protein (*HAND1*, GenBank AY460118), Achaete-scute homolog 2 (*MASH2*) and proliferation related acidic leucine rich protein (*PAL31*, GenBank AY460119). In general, the abundance of transcript for each increased with time in culture. Trophoblast cell lines were negative for the embryonic stem cell marker the homeobox gene *NANOG* [25] (data not shown). In all cases, the housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) served as a positive control for mRNA recovery and efficiency of reverse transcription (Fig. 1).

To probe PPAR γ transcriptional activity, we treated the cells either with 10-25 μM 15-d-PGJ $_2$ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), 1-25 μM troglitazone (Calbiochem, San

Diego, CA), 10-20 μM rosiglitazone (Cayman Chemicals), 5 μM retinoic acid (RA, Sigma) and/or 1 μM GW 9662 (Cayman Chemicals), all diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma at 0.044 % v/v). Experiments were conducted a minimum three times using freshly thawed trophoblast cells for each replicate experiment.

5.3.5 Proliferation assay

To determine DNA synthesis and cell proliferation, mink trophoblast cells were incubated overnight in the presence of 100 μM bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdU, Sigma) 6 days after initiation of culture with DMSO (control), or 15-d-PGJ₂. Cells were fixed in methanol and submitted to immunofluorescent analysis to detect incorporated BrdU, using 10 μl of anti-BrdU mouse monoclonal antibody (Amersham, Oakville, ON, Canada) containing 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNase, and a Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (Sigma) at 1:1000 dilution.

5.3.6 Reporter gene assay

Trophoblast cells were grown to confluence, seeded equally onto 24 well plates, and grown for 48 h in TS conditioned medium with FGF4 and heparin. Cells were transfected using Effectene Transfection Reagent (Qiagen), with 250 ng ml^{-1} PPREx3-tk-Luc construction vector, (generous gift of R. M. Evans, Salk Institute La Jolla, CA), and 20 ng ml^{-1} simian virus-40 Renilla luciferase vector (pRLSV40, Promega Corp., Nepean, ON, Canada). All plasmids used for transfection were prepared with Qiagen HiSpeed Plasmid Midi kit. To prepare the tk-Luc control vector harbouring no PPREs, the original plasmid was digested with the restriction enzymes Hind3 and Xba1. After dose and time

optimization, plasmids were transfected for 12 h in the presence of the Effectene reagent (according to manufacturer's specifications). Cells were then washed with 1X PBS, and transfection medium was replaced by fresh TS medium containing the treatments. Luciferase fluorescence was detected with the Dual Luciferase Assay System (Promega Corp.), using a Berthold 9501 luminometer. This experiment comprised three wells for each treatment, and was repeated three times using three populations of freshly thawed cells.

5.3.7 Flow cytometry

Mink trophoblast cells were grown to confluency, and seeded equally onto 6-well plates. At the time of plating, DMSO or 25 μ M of 15-d-PGJ₂ was added to the TS culture medium. The medium and treatment were changed every 2 days, and the cells were allowed to grow for 6 days before trypsinization and fixation in 70 % cold EtOH. The cells were stored at -20°C until flow cytometry analysis, at which time the fixed cells were washed once in 1X PBS, and incubated for 30 min to 1 h at room temperature with a propidium iodide (PI) solution (1X PBS, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 0.02 mg ml⁻¹ PI (Sigma), 2 mg RNase A). Flow cytometry analysis was performed with a BD Bioscience FACSVantage SE, and the data were processed with Cell Quest Pro software (BD Bioscience, Oakville, On, Canada).

5.3.8 RNA isolation and Real-time Polymerase Chain Reaction

Total RNA from uterine tissues and trophoblast cells in culture was isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription

was achieved with an initial quantity of 250 µg of total RNA, and 200 IU of Superscript RNase H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). The real-time relative quantification of cDNA from trophoblast cells in culture was achieved using a LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada), with the QuantiTect SYBR Green PCR kit from Qiagen. An initial hot start step was carried out at 95°C for 15 min. Each amplification cycle consisted of a denaturation step for 20 sec at 94°C, an annealing step according to the specific annealing temperature described in table 1 for 20 sec, and an amplification step at 72°C, for 20 sec. PCR quantification data were analysed using the second derivative method with the LightCycler Software version 3.5. Standard curves were generated for each set of primers. Amplified products were verified on agarose gel electrophoresis, and by sequencing. The primers (Table 1) used were designed with the Oligo Primer analysis software 4.0-s (National Biosciences, Plymouth, MN), and were based on a mink specific sequence, or on homology between human and at least another species (rat, mouse, dog, etc), aligned with Gene Jockey 5.0 Software (Biosoft, Cambridge, UK).

5.3.9 Statistical Analyses

Treatment means were analyzed using least square ANOVA and the general linear model procedures of SAS (Cary, NC). In the presence of a significant overall treatment effect, means were compared by Duncan multiple range and Tukey tests. A probability level of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

5.4 RESULTS

5.4.1 PPARG and RXRA expression are upregulated at the time of implantation

The *PPARG* anti-sense probe in *in situ* hybridization revealed the *PPARG* mRNA signal first appearing as the embryo attaches to endometrium (designated day 0 of implantation) (Fig. 2a). The expression was specific to the trophoblast, and further found only in trophoblast in contact with the endometrial epithelium. It was absent in uterine tissue and not detectable in either the pre-implantation uterus or between implantation sites (Fig. 2a). At day 4 following implantation, intense *PPARG* mRNA signal was detected in the placenta, principally in the region of the incipient labyrinth. There was prominent localization of *RXRA* mRNA, the heterodimerization partner of *PPARG*, in the trophoblast, co-localizing with the *PPARG* mRNA manifestation at the implantation site on the day of attachment (Fig. 2b). The *RXRA* message was also distributed more widely, present in the uterine glands and endometrial stroma on the day of implantation (Fig. 2b). At day 4 after implantation, *in situ* hybridization revealed that *RXRA* mRNA, while again more widespread, was present in the same regions that expressed the *PPARG* message (Fig 2b).

Immunohistochemistry indicated that messages identified by *in situ* hybridization were accompanied by the occurrence of the cognate *PPARG* and *RXRA* proteins, in almost all cases indicating co-expression. As expected, both signals were restricted to nuclei of trophoblast cells. On the day of implantation, *PPARG* protein localized to the nuclei of trophoblastic plaques (Fig. 3a). *PPARG* was likewise present in nuclei of syncytiotrophoblast cells of the incipient chorionic villi invading the luminal and the

glandular epithelium of the uterus (Fig 3 b,c). By day 4 following implantation, PPARG protein was strongly expressed in the syncytiotrophoblast that surrounds the fetal villi and the maternal endothelium in the proximal labyrinth region (Fig. 3d), as well as in the syncytiotrophoblast surrounding the villi from the distal labyrinth region (Fig. 3e). On the day of implantation, RXRA protein localized to the cells of the trophoblastic plaques prior to and following contact with the endometrial epithelium (Fig. 3 f,g). It was most prominent in the enlarged cytotrophoblast associated with the invading villus (Fig 3 h,i). RXRA was not evident in the syncytiotrophoblast at day 4 post-implantation (Fig 3 h,i). As shown in Fig. 3 j,k, the sections that were not incubated with first antibody are negative for the signal.

5.4.2 The prostanoid, 15-d-PGJ₂, an endogenous ligand for PPARG, modulates cell cycle progression of the trophoblast cells in vitro

As *in situ* hybridization and immunohistochemistry revealed *PPARG* expression to be specific to differentiating trophoblast cells during implantation and placental development, we employed trophoblast cells derived from pre-implantation mink blastocysts to further delineate the effects of PPARG activation. To establish the occurrence of PPAR signaling, trophoblast cells were passaged and grown to approximately 80 % confluence, then transfected with a luciferase reporter gene construct driven by three PPRE elements and a minimal promoter (PPREx3-tk-Luc). We tested two PPARG ligands, the antidiabetic thiazolidinedione, troglitazone, and a natural ligand, 15-d-PGJ₂. Both ligands triggered PPARG transcriptional activity two to three fold over 36 h, with apparent

dose dependence for 15-d-PGJ₂, but not troglitazone, where the response was of equal magnitude with doses of 10 and 25 μ M (Fig. 4). The addition of a specific PPARG antagonist, GW 9662, inhibited the generation of the luciferase signal and DMSO, while at the molar concentration employed, had no distinguishable effect on basal PPRE induced transcription (Fig 4a). Retinoic acid mildly activated the construct and modestly potentiated the effects of 15-d-PGJ₂ (data not shown). The control vector, the tk-Luc plasmid, which does not harbor PPREs, did not display enhanced luciferase activity in the presence of 25 μ M 15-d-PGJ₂ (Fig 4). These results indicate that both ligands act specifically through the canonical PPAR transcriptional signaling pathway.

Based on these findings, we chose doses of 25 μ M 15-d-PGJ₂ and 10 μ M troglitazone to further examine PPARG effects and mechanisms in trophoblast cells in vitro. Treatment of trophoblast cultures with 15-d-PGJ₂ induced an evolution in cell morphology (Fig 5a). In the control group treated with DMSO, after 48 h of culture, trophoblast cells proliferated in the form of well-delimited colonies of small cells, reaching confluence over the first 2 days of culture. At 96 h after plating, cells of the control group were substantially more abundant, and appeared to proliferate actively and, while remaining loosely attached to the Petri surface, were strongly linked together. Between day 4 and 8 following initiation of culture in the control group, cells detached gradually from the plate and formed blastocyst-like floating vesicles. The formation of these vesicles concurs with observations typical of mouse trophoblast cell culture, as described in Tanaka et al. [23]. In contrast to control cultures, the 15-d-PGJ₂ treated cell group appeared to cease proliferation. This was confirmed by studies of BrdU incorporation into trophoblast

cells, indicating extensive proliferation in control cells, but none in 15-d-PGJ₂ treated cells (Fig. 5b). In addition, prostanoid treated cells displayed extensive expansion of the cytoplasm, accompanied by increased adherence to the surface of the plate (Fig. 5a). These radical changes in cell morphology were first observable at day 2 following initiation of 15-d-PGJ₂ treatment. Staining of cultures with the DAPI reagent to localize nuclei revealed substantial reductions in cell density and the presence of enlarged nuclei and multinuclear cells in cultures treated with 15-d-PGJ₂ (Fig. 5a). The addition of both retinoic acid and 15-d-PGJ₂ to the cells accelerated the rate of morphological differentiation (Fig 5a). In contrast, the ligand troglitazone did not induce morphological changes as profound as seen in 15-d-PGJ₂-treated cultures (Fig 4a). Troglitazone appeared to reduce cell proliferation at days 2 and 4, while on subsequent days, the cells underwent rapid proliferation, evoking the pattern observed in the control cultures.

To examine the apparent influence of 15-d-PGJ₂ on the regulation of trophoblast cell cycle, cells were cultured as described above, treated with 15-d-PGJ₂ for 8 days and subjected to flow cytometric analysis for DNA content (Fig. 6). Large, multinuclear cells that did not enter the capillary of the apparatus were excluded from the analysis. The results revealed that 15-d-PGJ₂ substantially altered the DNA content of the cell populations. The proportion of cells displaying the 2n complement of DNA was reduced from 68 % to 39 % by the higher dose of 15-d-PGJ₂ while the proportion containing 4n or more increased from 13 to 41 %. Troglitazone produced a similar, albeit muted response, as the increase in the frequency of the 4n or more complement approximated 3 % (data not shown). This result was anticipated, since troglitazone treatment of the trophoblast cells in

vitro did not induce the same changes in cell morphology as did 15-d-PGJ₂ (Fig. 5a).

The augmentation in the proportion of cells with two or more times the concentration of the G-phase complement of DNA under the influence of 15-d-PGJ₂ is interpreted to indicate the presence of a polyploid cell population, as has been previously reported for whole mink blastocysts [26]. These findings are interpreted as further indication that 15-d-PGJ₂ directs trophoblast differentiation.

5.4.3 Treatment with 15-d-PGJ₂ induces a PPARG-positive and a potentially invasive trophoblast cell phenotype in vitro

We then undertook immunolocalization of PPARG to determine its association with the differentiated phenotype in trophoblast cells in culture. The results demonstrate a low level of PPARG nuclear signal in control cultures (Fig. 7a). In cultures treated with 15-d-PGJ₂, both cells with large nuclei and multinucleated cells displayed an intense signal (Fig. 7a).

To determine whether PPARG expression was upregulated by its own ligand in the course of differentiation, real-time PCR amplification was employed. The results show that *PPARG* transcript abundance was significantly elevated in cultures subjected to 15-d-PGJ₂ over 8 days, relative to control where the mRNA was substantially lower and remained stable throughout the time of culture (Fig. 7b). Overall, these data suggest that 15-d-PGJ₂, acting through PPARG, is involved in the differentiation of cytotrophoblast cells into enlarged trophoblast cells and multinucleated cells.

To further investigate the PPAR gamma induction of mink trophoblast cell differentiation, immunohistochemical analysis and real-time PCR measurement of the abundance of the genes related to trophoblast attachment and differentiation was conducted. Osteopontin is a secreted glycoprotein involved in the integrin signaling pathway. It is expressed by invading trophoblast [27], and there is evidence for osteopontin modulation by PPARG in other tissues [28]. We tested 15-d-PGJ₂ regulation of osteopontin gene expression in mink trophoblast cells. Real-time RT-PCR revealed that osteopontin mRNA is upregulated six fold over 8 days of chronic 15-d-PGJ₂ treatment (Fig. 7d). To establish a functional link between *PPARG* transcriptional activity and osteopontin protein expression, we examined the localization of the two proteins, osteopontin and PPARG, in the trophoblast cells in cultures. The results (Fig. 7c) demonstrate the virtual absence of nuclear PPARG and cytoplasmic osteopontin in DMSO treated control cultures. In contrast, treatment with 15-d-PGJ₂ induced development of both the large and multinuclear PPARG-positive cell phenotypes, as well as extensive cytoplasmic expression of osteopontin (Fig. 7c). We also noted an inexplicable nucleolar signal to the osteopontin antibody, present in DMSO treated and 15-d-PGJ₂ treated cultures.

The expression of the adipose differentiation-related protein adipophilin, (also known as ADRP and ADPH), was evaluated in response to PPARG ligands. Adipophilin is ubiquitously expressed and is a known target gene of PPARG, during adipocyte [29] and human trophoblast cell differentiation [30]. In the carnivore trophoblast line, the abundance of adipophilin mRNA was stably increased in cultures treated for 48 and 96 h with 15-d-PGJ₂ (Fig. 8a). The activation of RXRA was expected to increase the

transcriptional activity of the heterodimer formed by PPARG and RXRA. The results (Fig. 8a), demonstrate that a combination of retinoic acid and 15-d-PGJ₂ provoked a marked increase in the expression of adipophilin at 96 h, providing additional evidence to suggest that PPARG mediates adipophilin gene expression in trophoblast cells. Using the same paradigm, we examined two synthetic PPARG ligands, troglitazone and rosiglitazone, two members of the thiazolidinediones (TZD) family. There was a trend ($P=0.07$) toward modest increases in adipophilin transcript abundance induced by troglitazone at 48 h, but no differences were evident at 96 h (Fig. 8b). Rosiglitazone produced identical results (data not shown).

5.5 DISCUSSION

The information generated in this investigation demonstrates that transcriptional modulation by the nuclear receptor PPARG is involved in implantation and in the formation of the endothelio-chorial placenta in a carnivore model. The clear distribution of the PPARG signal in enlarged cytotrophoblast and syncytiotrophoblast nuclei, as shown by in situ hybridization and immunohistochemistry, suggests it may play an important role for PPARG in formation of the syncytiotrophoblast. Following adhesion to the mustelid uterus, the syncytial cells penetrate the uterine luminal epithelium and insinuate through the glandular epithelium, which degenerates with contact to trophoblast cells [2, 4]. *PPARG* mRNA and protein are strongly expressed in these invading cells, and a representative expression of *RXRA* mRNA and protein was shown in the same cell type. This early expression of PPARG and its transcriptional partner in trophoblastic plaques before and during attachment, as well as during the initial epithelial penetration has not been

previously described in any species. Gene deletion studies in mice have shown PPARG to be essential to placental formation [8], and PPAR delta (PPARD) in trophoblast differentiation [31]. The present work is the first demonstration of a temporal expression of PPARG associated with early invasion of the trophoblast and is consistent with the well known role of this nuclear receptor as a modulator of cell invasion in liposarcomas and colon, breast and prostate carcinomas [32, 33]. It further suggests a new role for PPARG in organization of the implantation process.

We employed mink trophoblast cell lines to demonstrate that PPARG is an authentic regulator of gene expression in the trophoblast. PPARG is transcriptionally active in the presence of both natural (15-d-PGJ₂) and synthetic (troglitazone) ligands, evidenced by their robust stimulation of transcription of genes driven by PPRE in our in vitro culture system. Moreover, this stimulation of transcription was specific to the nuclear receptor, as GW 9662, a specific antagonist of PPARG, abrogated the transcriptional effects of both ligands. The response was dose-dependent when 15-d-PGJ₂ was used to stimulate PPRE-mediated transcription. A similar low magnitude effect of PPARG ligands on luciferase signal was also reported by other authors, notably by Allred and Kilgore [34], in cell lines expressing PPARG.

As a principal effect of PPARG in adipose tissue [8, 11], colon cancer and other cancers is the induction of terminal differentiation (reviewed in [17]), we examined the effects of the natural ligand on trophoblast cell differentiation. In these trials, 15-d-PGJ₂ attenuated proliferation and induced differentiation of the cells over 8 days, with the first morphological signs present as early as 48 h. These morphological changes were

accompanied by an increase in PPARG protein and mRNA and by formation of enlarged and multinucleated cells. The rapid induction of differentiation in the presence of PPARG ligands, and the upregulation of PPARG during differentiation in the mink trophoblast cells are consistent with observations in other species. In the human BeWo choriocarcinoma cell line, troglitazone accelerates differentiation of cells into human chorionic gonadotropin (hCG)-producing syncytia [35]. In that study, the acquisition of the completely differentiated phenotype, as indicated by an increase in hCG secretion, occurs within 72 h of initiation of treatment of the human cell line. It is likewise marked by a strong increase in PPARG transcriptional activity [35]. In addition, PPARG is robustly expressed during differentiation in the murine trophoblast stem cells [36]. Furthermore, the *PPARG* promoter contains PPAR-regulatory sequences, suggesting that PPARG can auto-regulate the transcription of its own gene [37, 38]. Together these observations support the view that PPARG-activated transcription is an early event in mink trophoblast cell differentiation.

Phenotypic analysis of PPARG knockout mice revealed that the nuclear receptor is essential for development of the labyrinth layer of the placenta, and for the proper maternal vessel establishment within the labyrinth [8]. Likewise, the *RXR α* knockout mouse displays abnormalities of the labyrinthine and spongiotrophoblast layers of the placenta, also leading to embryonic lethality [10]. The mouse placenta is hemochorial and monocotyledonary, and *PPAR gamma* mRNA is present in both the labyrinth and spongiotrophoblast regions from embryonic day 8.5 onward [8, 39]. The situation is similar to the rat, where the syncytial cells of the spongiotrophoblast and the labyrinth

regions express both PPARG and RXRA from embryonic day 11 [37, 40]. In humans, PPARG is expressed in the placenta during the second trimester in the villous and columnar cytotrophoblasts, while during the third trimester or in term placentas, PPARG expression appears also in the syncytiotrophoblast [35, 39]. Morphological evidence in the present investigation suggests a similar role for PPARG and RXRA in development of the fetal villi that form the surface of exchange in the mink placenta. We show PPARG and RXRA to be expressed in the trophoblast at the time of attachment and implantation. In contrast, in mice, rats and humans, PPARG is not expressed at the time of implantation, suggesting a fundamental difference between the strategies of embryo implantation among these species.

Given the distribution of PPARG during placental development, we sought to determine by real-time PCR what genes might mark the process of differentiation, and thus might be targeted. Adipophilin (ADFP), the human homolog of the mouse adipose differentiation related protein is believed to be involved in cellular lipid uptake [41, 42]. In the mink, 15-d-PGJ₂ triggered upregulation of adipophilin in trophoblast cells by 48 h. This upregulation of ADFP has also been demonstrated in human trophoblasts following exposure to troglitazone for 4 h [30]. These data support the view that the transcriptional activation of PPARG target genes is an early event, occurring following initiation of trophoblast differentiation. Moreover, the consistently elevated levels of adipophilin in the cells under the influence of 15-d-PGJ₂ for 8 days suggest that the syncytiotrophoblast cells have a lipid uptake requirement during the process of differentiation. In differentiated human trophoblast, expression patterns of PPARG and the related nuclear receptor, PPARD, are similar [43]. It is therefore of interest that PPARD is necessary for trophoblast

differentiation in the mouse, and that it drives adipophilin expression [31]. Our in situ hybridization analysis of *PPARD* transcripts during the time of implantation and placenta formation in mink revealed expression specific to uterine stroma, and virtually absent in the trophoblast (data not shown). This further point to a disparity between the implantation processes of the rodent hemochorial and the carnivore epitheliochorial placenta types.

Osteopontin is involved in cell-cell and cell extracellular matrix contact, through binding to the alpha-nu category of integrin receptors. In the rat, pig and sheep, osteopontin is present in luminal and glandular epithelium throughout pregnancy [27]. The expression of osteopontin was shown to be regulated in human cytotrophoblasts and ovine uterine luminal epithelium by progesterone [44, 45]. When human cytotrophoblast cells are placed in culture, they rapidly aggregate and osteopontin expression is downregulated [46]. When the aggregated cells undergo fusion, osteopontin expression increases [45]. These data demonstrate that, in the human model, osteopontin is upregulated in syncytiotrophoblast cells. In the present study, osteopontin mRNA and protein were shown to be upregulated following 15-d-PGJ₂-mediated PPARG activation. This provides additional evidence to suggest the involvement of PPARG in trophoblast cell attachment and syncytium formation in the trophoblast cells at the onset of embryo implantation.

In summary, we provide the first evidence to demonstrate that the nuclear receptor PPARG is present in the carnivore trophoblast during implantation and placenta formation. We further demonstrate by use of homologous trophoblast cells in vitro that PPARG ligands induce differentiation of the mink trophoblast, including induction of syncytiotrophoblast formation and escape from the cell cycle. The upregulation of

differentiation specific genes in the placenta under the influence of PPARG ligands provides a mechanism by which blastocyst and endometrial prostanoids regulate the formation and maintenance of the mink placenta through gestation.

5.6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Mira Dobias-Goff for invaluable technical assistance, M. Armand Richard, Marie-Ève Charest and Geneviève Charest for aid with experimental animals, Dr. Patrick Vincent for flow cytometry and Simon-Pierre Demers for aid in preparation and revision of the manuscript. This investigation was funded by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to B.D. Murphy.

5.7 REFERENCES

1. Carter AM, Enders AC. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 46.
2. Enders AC, Schlafke S. Implantation in the ferret: epithelial penetration. *Am J Anat* 1972; 133: 291-315.
3. Enders AC, Schlafke S, Hubbard NE, Mead RA. Morphological changes in the blastocyst of the western spotted skunk during activation from delayed implantation. *Biol Reprod* 1986; 34: 423-437.
4. Enders AC, Mead RA. Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the western spotted skunk. *Anat Rec* 1996; 244: 297-315.

5. Gulamhusein AP, Beck F. Light and electron microscope observations at the pre- and early post-implantation stages in the ferret uterus. *J Anat* 1973; 115: 159-174.
6. Enders AC. Histological observations on the chorio-allantoic placenta of the mink. *Anat Rec* 1957; 127: 231-245.
7. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7355-7359.
8. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; 4: 585-595.
9. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999; 4: 597-609.
10. Sapin V, Dolle P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P. Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXRalpha null fetuses. *Dev Biol* 1997; 191: 29-41.

11. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147-1156.
12. Song JH, Sirois J, Houde A, Murphy BD. Cloning, developmental expression, and immunohistochemistry of cyclooxygenase 2 in the endometrium during embryo implantation and gestation in the mink (*Mustela vison*). *Endocrinology* 1998; 139: 3629-3636.
13. Lopes FL, Desmarais J, Ledoux S, Gevry NY, Lefevre P, Murphy BD. Transcriptional regulation of uterine vascular endothelial growth factor during early gestation in a carnivore model, *Mustela vison*. *J Biol Chem* 2006; 281: 24602-24611.
14. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83: 803-812.
15. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-819.
16. Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG, Leibowitz MD. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* 1996; 137: 4189-4195.
17. Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A. PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 687-693.

18. Lopes FL, Desmarais J, Gevry NY, Ledoux S, Murphy BD. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. Biol Reprod 2003; 68: 1926-1933.
19. Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK. Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. Endocrinology 1994; 134: 971-981.
20. Lord E, Murphy BD, Desmarais JA, Ledoux S, Beaudry D, Palin MF. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma transcripts in swine endometrial tissue during early gestation. Reproduction 2006; 131: 929-942.
21. Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. Nature 2006; 439: 475-479.
22. Desmarais JA, Bordignon V, Lopes FL, Smith LC, Murphy BD. The escape of the mink embryo from obligate diapause. Biol Reprod 2004; 70: 662-670.
23. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. Science 1998; 282: 2072-2075.
24. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. Semin Cell Dev Biol 2000; 11: 105-113.
25. Simmons DG, Cross JC. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. Dev Biol 2005; 284: 12-24.

26. Zybina EV, Zybina TG. Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int Rev Cytol* 1996; 165: 53-119.
27. Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 2003; 69: 1458-1471.
28. Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res* 2002; 90: 348-355.
29. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997; 38: 2249-2263.
30. Bildirici I, Roh CR, Schaiff WT, Lewkowski BM, Nelson DM, Sadovsky Y. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 6056-6062.
31. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3266-3281.
32. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998; 58: 3344-3352.

33. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altioek S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 237-241.
34. Allred CD, Kilgore MW. Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 235: 21-29.
35. Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3874-3881.
36. Shalom-Barak T, Nicholas JM, Wang Y, Zhang X, Ong ES, Young TH, Gendler SJ, Evans RM, Barak Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls Muc1 transcription in trophoblasts. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10661-10669.
37. Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H, Morita I. Expression and function of PPARgamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 497-501.
38. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, Berger J. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 431-437.

39. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 249: 10-15.
40. Wang J, Armant DR. Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs* 2002; 172: 190-201.
41. Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 1999; 274: 16825-16830.
42. Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4267-4275.
43. Rodie VA, Young A, Jordan F, Sattar N, Greer IA, Freeman DJ. Human placental peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma expression in healthy pregnancy and in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12: 320-329.
44. Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt RC. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod* 2001; 65: 820-828.
45. Omigbodun A, Ziolkiewicz P, Tessler C, Hoyer JR, Coutifaris C. Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* 1997; 138: 4308-4315.

46. Daiter E, Omigbodun A, Wang S, Walinsky D, Strauss JF, 3rd, Hoyer JR, Coutifaris C. Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology* 1996; 137: 1785-1790.

5.8 TABLES AND FIGURES

Table 5.1 Primers used for Real-Time PCR.

Name ^a	Sequence (5'-3')	Product length (bp)	Annealing (°C)	GenBank Accession no. ^b
Osteopontin (SPPI)-F	CATCTCAGAAGCAGAATCTCC	133	53	Mink (not published)
Osteopontin-R	TCATCTCTGTCATCGTCATCC			
PPARG-F	TGATGAATAAAGATGGGGTCCTC	189	53	AY050524 (mink)
PPARG-R	TCTCCACTGAGAATAATGACAGC			
Cyclophilin (PPLA)-F	TAATGGCACTGGTGGCAAGTC	135	55	Mink (not published)
Cyclophilin-R	CAGATGAAGAACTGGGAACCG			
Adipophilin (ADFP)-F	TGGGATCCCTGTCTACCAAG	134	55	NM_001122 (human);
Adipophilin-R	CCTGGCAAATTCAATCAGGT			NM_007408 (mouse)

^a F: Forward; R: Reverse. ^b Design of the primers is based on a sequence homology between 2 different species, when 2 accession numbers are presented.

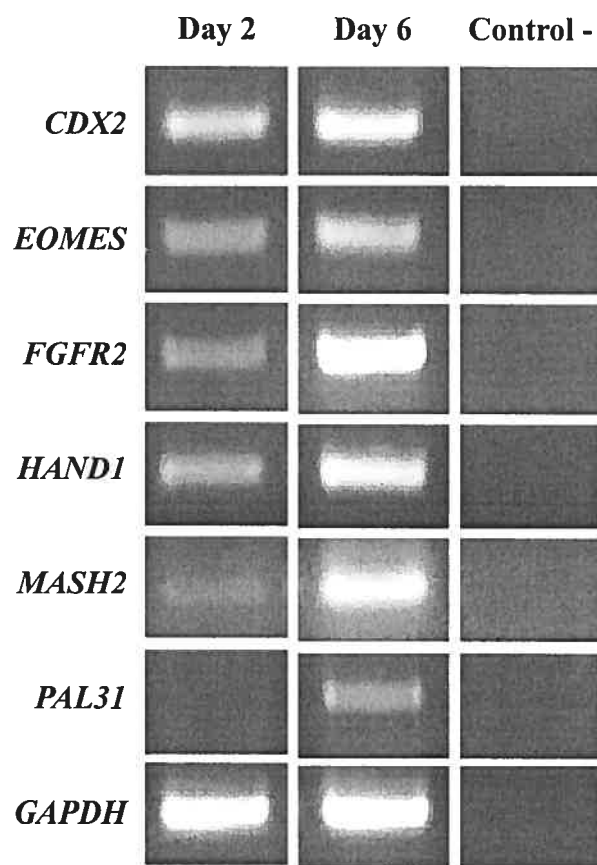


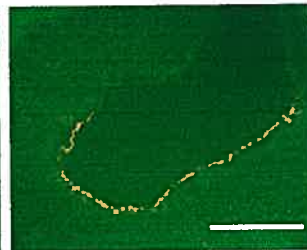
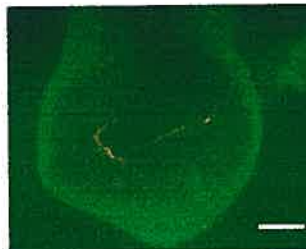
Figure 5.1 Trophoblast cultures express marker genes indicative of chorionic provenance of the cells. Mink primers were designed from using a comparative, multispecies approach for a series of putative marker genes in mink trophoblast cells at 2 and 6 days after initiation of culture and PCR amplicons were resolved by electrophoresis. The markers are: caudal type homeo box transcription factor 2 (*CDX2*), comesodermin (*EOMES*), fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*), the basic helix-loop-helix transcription factor (*HAND1*), Achaete-scute homolog 2 (*MASH2*) and proliferation related acidic leucine rich protein (*PAL31*). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) served as positive control for mRNA recovery and reverse transcription.

a) *PPARG*

Pre-implantation



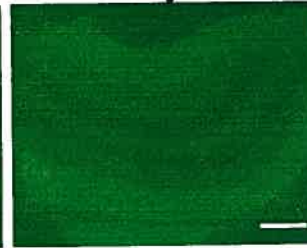
Implantation, Day 0



Post-Implantation,
Day 4

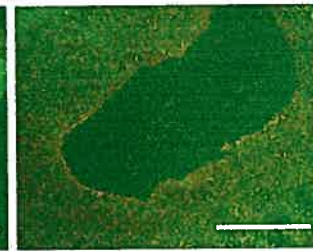
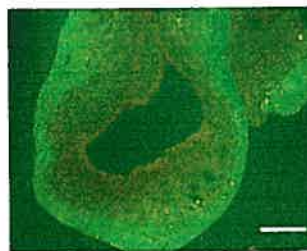


Inter-implantation site,
Day 4



b) *RXRA*

Implantation, Day 0



Post-Implantation, Day 4

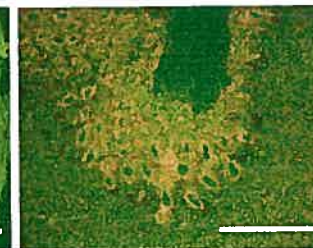
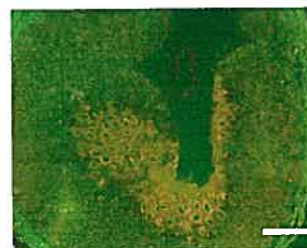
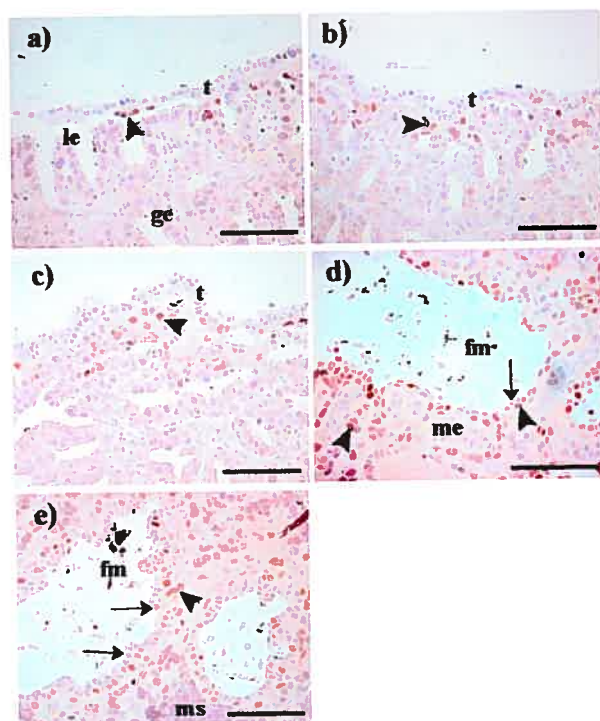


Figure 5.2 *PPARG* (a) and *RXRA* (b) mRNA localization by *in situ* hybridization in mink uteri. The samples for frozen sections were collected at pre-implantation, 5 days after the escape of the embryo from diapause, at implantation (day 0) or at early post-implantation (day 4). The dark field photomicrographs reveal the autoradiographic signal in orange. Note the expression of *PPARG* exclusive to trophoblastic tissue, and the broader distribution of *RXRA*, mRNA in the trophoblastic tissue as well as in the epithelia and stroma of the uterus. The pre-implantation uterus and the inter-implantation site display no signal for *PPARG*. Magnification bars = 1 mm.

PPARG



RXRA

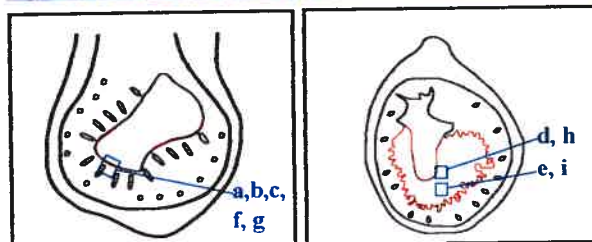
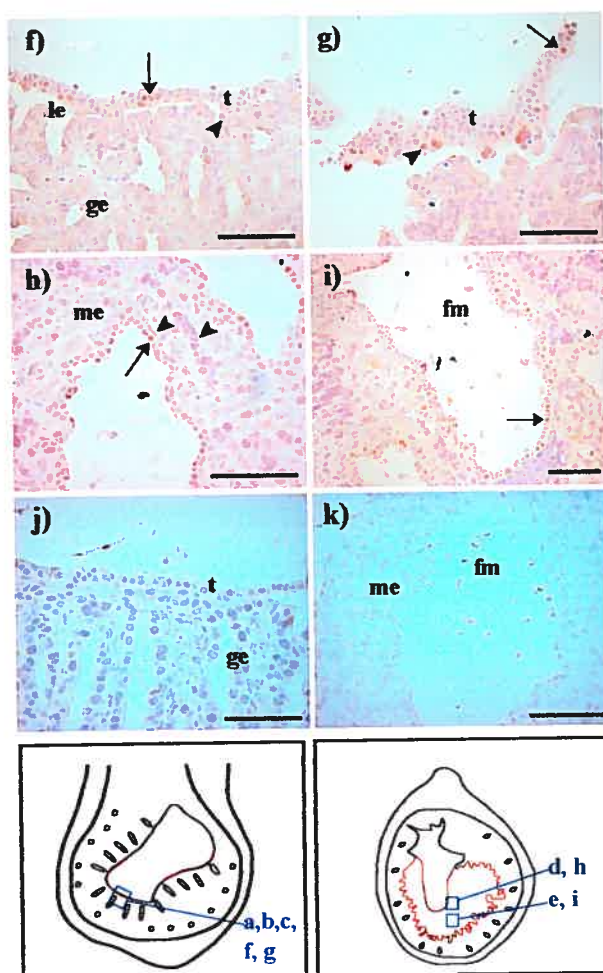


Figure 5.3 Immunocytochemical localization of PPARG and RXRA proteins at implantation sites at days 0, 1 and 4 after implantation. On the day of implantation, the red signal indicates that the PPARG and RXRA signals are present in trophoblastic plaques (**a, f, marked with long arrow**), and RXRA is detected along with PPARG in the syncytial trophoblast intruding the maternal epithelium (**b, f, arrowheads**). One day after implantation, PPARG and RXRA are expressed in the syncytiotrophoblast cells (**c, g**). At day 4 after implantation, PPARG signal is evident in the syncytiotrophoblast cells, surrounding the fetal villi and in the maternal capillaries in the labyrinth zone (**d**). Panel shows RXRA while less pronounced is present in the syncytiotrophoblast (**arrowhead**) and also in cytotrophoblast cells (**arrow**). In the distal labyrinth zone, PPARG is again found to be specific to the syncytiotrophoblast cells (**e**). RXRA is specific to the cytotrophoblast cells but was not evident in the syncytiotrophoblast (**i**). (j) and (k) are the negative controls for early implantation site and day 4 implantation site, in the labyrinth zone, respectively. The bottom panel represents the placental areas described in each figure. **le**, luminal epithelium; **ge**, glandular epithelium; **t**, trophoctoderm; **me**, maternal endothelium; **fm**, fetal mesenchyme of the villus; **ms**, maternal symplasma. The arrow indicates the cytotrophoblast cells, the arrowheads, the syncytiotrophoblast cells. Magnification bars = 100 μm .

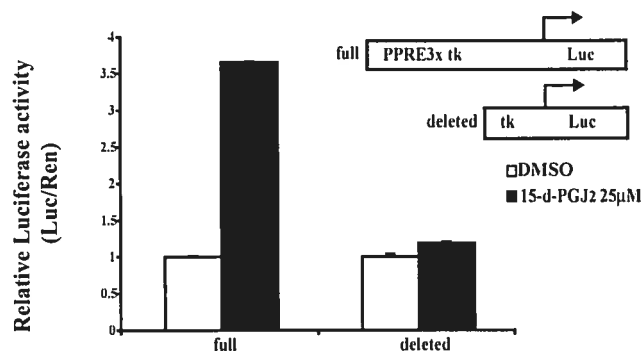
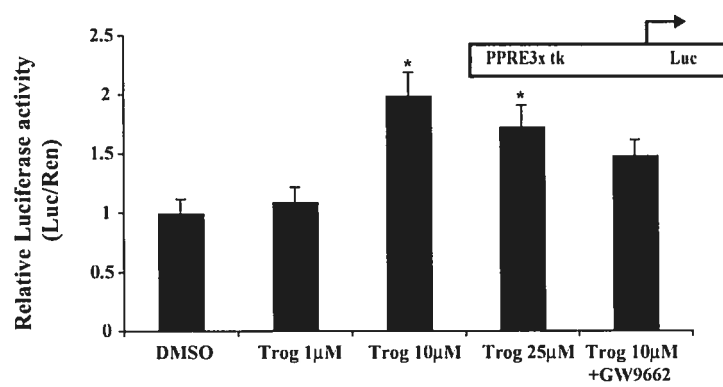
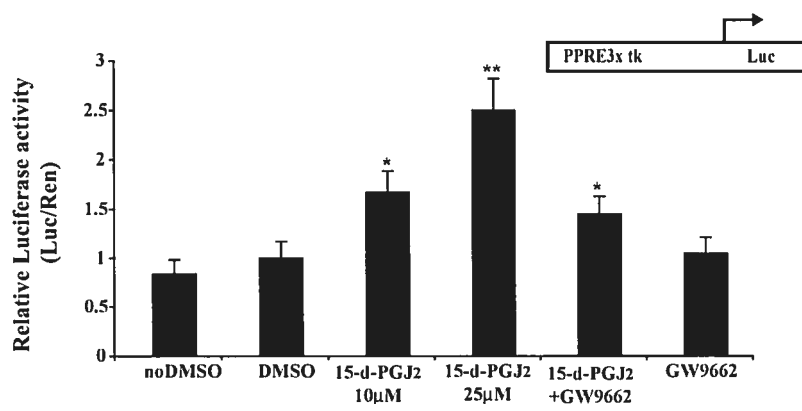


Figure 5.4 The PPARG ligands 15-d-PGJ₂ and troglitazone induce transcriptional activation of PPARG target-genes. In mink trophoblast cells cultured in vitro, a PPREx3-tk Luc reporter construct was transfected along with the SV40-Renilla reporter gene as a control for transfection efficiency. Following treatment for 36 h, 15-d-PGJ₂, at a 25 μM concentration, promoted an optimal luciferase activity, which was reduced by the addition of 1 μM of the specific PPAR antagonist GW9662 to the culture medium. Troglitazone (Trog) enhanced luciferase activity significantly at a 10 μM concentration, and addition of GW9662 limited the response in luciferase activity. DMSO had a negligible effect on PPARG transcriptional activity. In the absence of the PPRE3x in the construct there was no enhancement of luciferase signal by PPARG ligands (bottom panel). Mean ± SEM promoter activity, in terms of relative luciferase signal is presented. The asterisk indicates a mean value significantly different from the DMSO control, ($P > 0.05$).

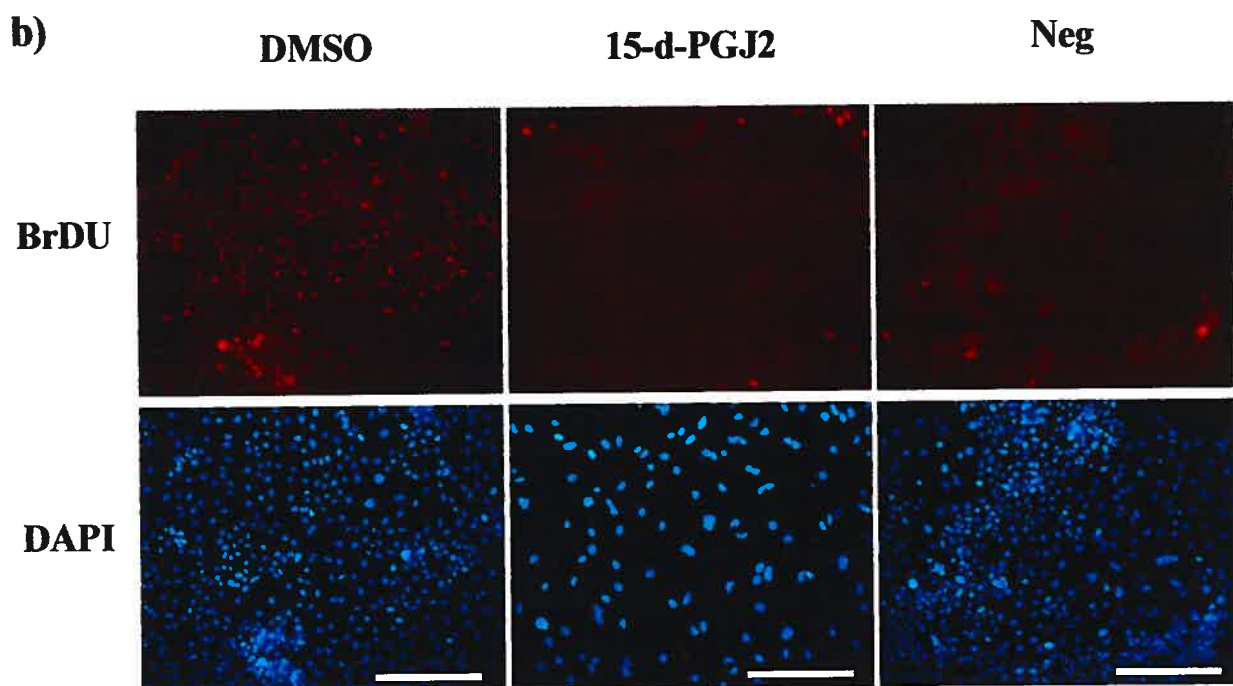
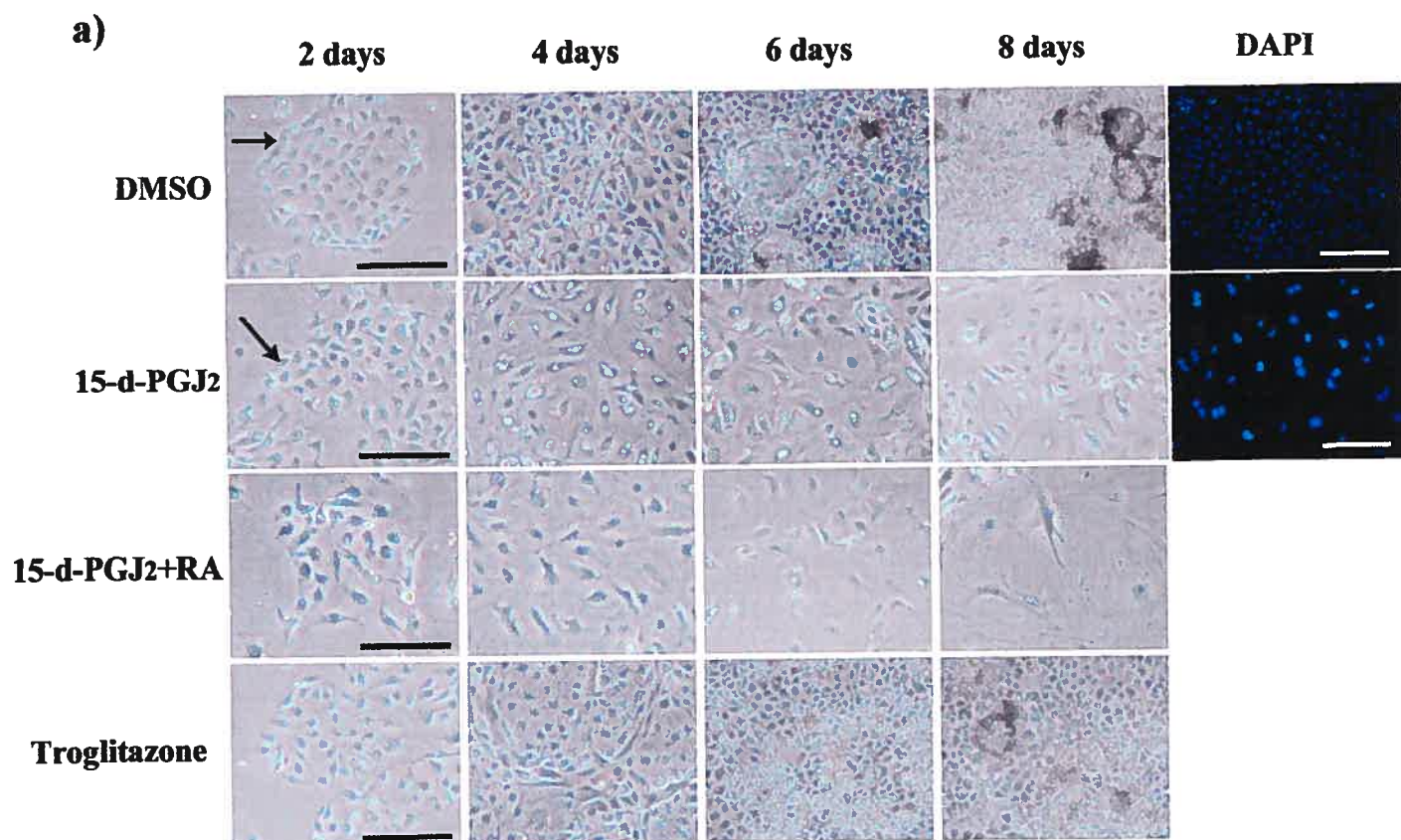


Figure 5.5 The PPAR γ ligand 15-d-PGJ $_2$ induces: a) a change in trophoblast cell morphology and b) a decrease in cell proliferation activity in vitro. a) Morphological changes are evident at 2 days of culture with the ligand, where arrows indicate the colony delimitation; at day 8, the cells display a morphology characteristic of the mouse TS cells the cells are growing compactly and form floating vesicles. The cells treated with 15-d-PGJ $_2$ are fewer in a same microscopic area, and their expanded cytoplasm attached to the bottom of the petri dish, and the cells frequently contain two nuclei, as seen with DAPI deoxyribonucleic acid coloration in the dark field microphotograph. In the presence of retinoic acid (RA), 15-d-PGJ $_2$ accelerated the rate of the morphological changes of the trophoblast cells. In contrast, the synthetic ligand, troglitazone (Trog) did not trigger a complete arrest in cell proliferation, as did 15-d-PGJ $_2$ alone or with retinoic acid. b) BrdU incorporation as detected by immunofluorescence in the control culture (DMSO), or in the 15-d-PGJ $_2$ -treated culture after 6 day of treatment (left panel). The DNA is revealed with DAPI staining (right panel). The cell culture in the negative control was submitted to the immunofluorescence staining, but not previously incubated with BrdU. Magnification bars= 200 μ m.

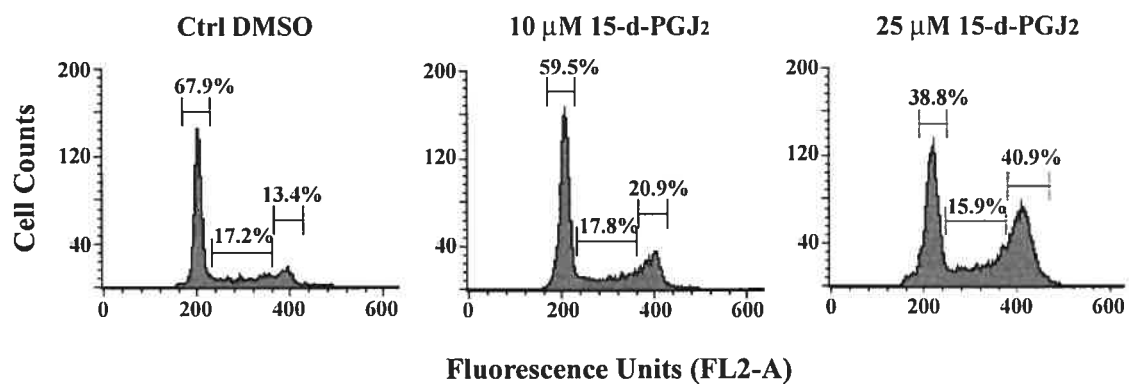


Figure 5.6 Treatment of trophoblast cells with 15-d-PGJ₂ promotes a change in DNA complement. Frequency analysis of the numbers of cells per channel as a function of relative fluorescence intensity. The peak at 200 fluorescence units represents cells with the 2n complement of DNA, the region from approximately 350-400 represents those with a 4n or greater complement, the region between represents cells in transition. Doses of 10 and 25 μ M 15-d-PGJ₂ increased the number of cells with greater than 2n complement of DNA.

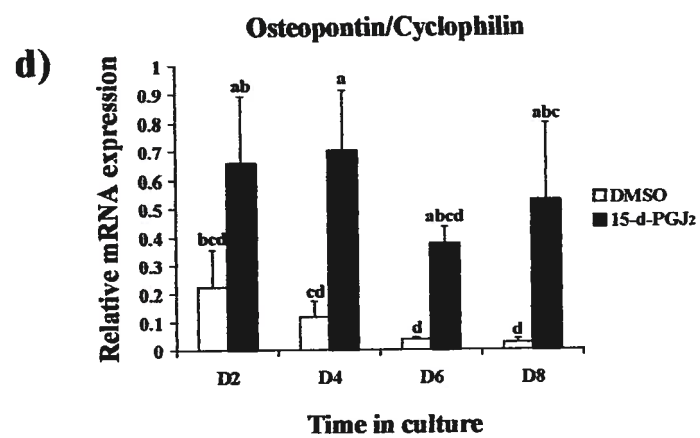
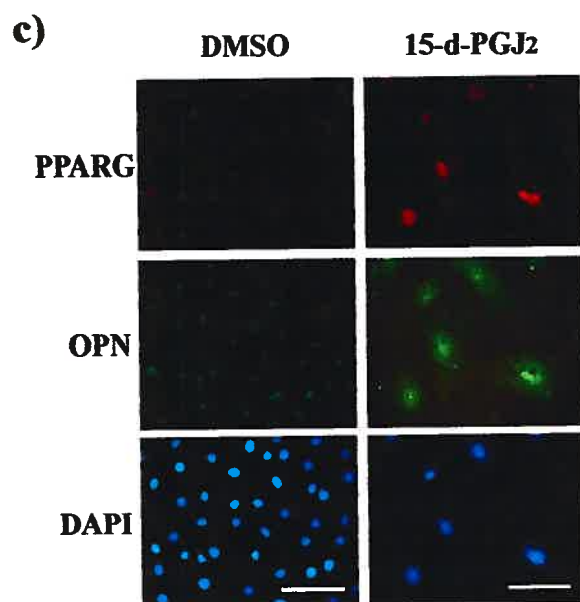
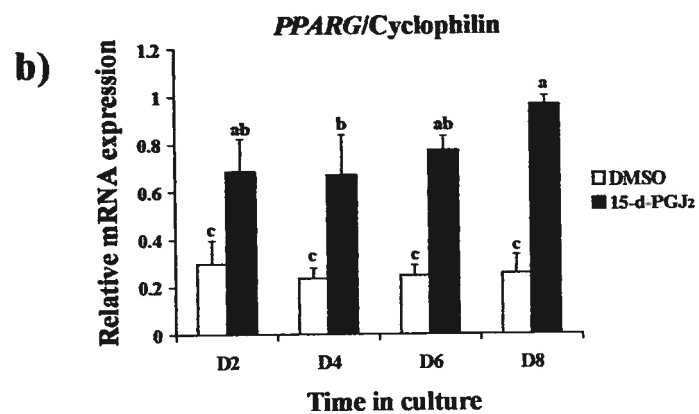
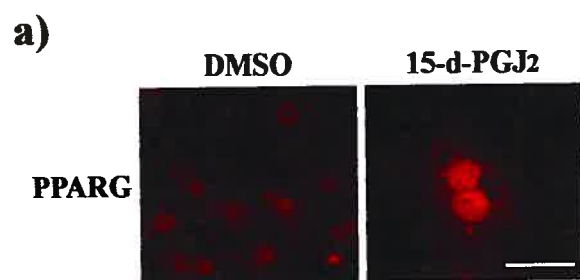
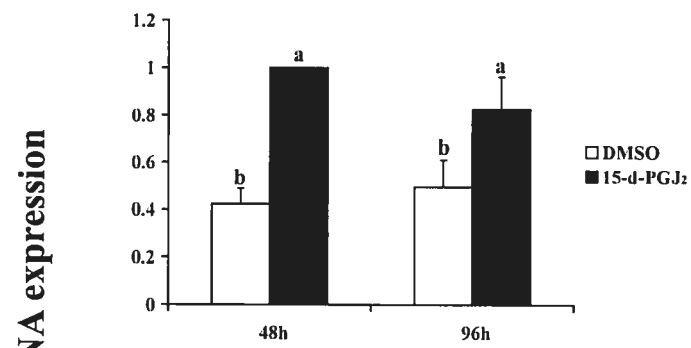
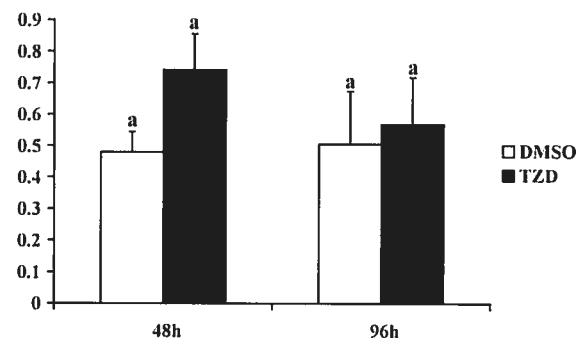


Figure 5.7 Treatment with 15-d-PGJ₂ increases PPARG protein and mRNA and promotion of an attachment competent and potentially invasive trophoblast cell phenotype in the trophoblast cells. **a)** Nuclear localisation of PPARG in the control trophoblast cells, or in the trophoblast cells cultured in the presence of 15-d-PGJ₂. The cells were fixed on a coverslip, and processed for immunocytochemistry with the PPARG first antibody, and a Cy3-coupled second antibody. Note that the large binucleated cells strongly express PPARG, while the nuclei of proliferating cells are essentially PPARG-negative (Magnification bar= 25 μ m). **b)** Real-time PCR amplification and relative quantification of *PPARG* mRNA showing increases in transcript abundance in 15-d-PGJ₂-treated, but not DMSO control cultures. Cyclophilin (*PPIA*) served as control **c)** Concomitant immunolocalization of PPARG and osteopontin (SPP1) in the trophoblast cells treated with the control DMSO, or with 15-d-PGJ₂ for 6 days. The DNA was counterstained with DAPI, and signals visualized by fluorescence microscopy. Treatment with 15-d-PGJ₂ increases PPARG and osteopontin (SPP1) protein signals in trophoblast cultures at day 2 of culture. Magnification bars= 50 μ m. In panels **b)** and **d)**, means bearing different superscripts are different at $P < 0.05$.

a) Adipophilin/ Cyclophilin



c)



Time in culture

Figure 5.8 Adipophilin (*ADFP*) is a PPARG target gene in trophoblast cells. a)

Realtime PCR revealed that treatment with 15-d-PGJ₂ for 48 or 96 h induced increases in adipophilin transcript abundance in cultured mink trophoblast cells at 48 and 96 h (Mean \pm sem, means bearing different superscripts are different at $P < 0.05$). **b)** Treatment with troglitazone (Trog) produced a tendency toward increase at 48 h ($P = 0.07$), while no effect was seen at 96 h.

6.0 DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette étude portant sur les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison apporte plusieurs éléments inédits qui permettent de mieux comprendre quels sont les mécanismes qui dirigent le processus d'implantation, en utilisant une espèce comparative autre que la souris ou l'humain. Dans cet ouvrage, nous nous intéressons au paradigme qui suggère que suite à la sortie de la diapause, sous l'influence de facteurs maternels, plusieurs mécanismes sont enclenchés dans l'embryon pour lui permettre de se développer et de se préparer à l'implantation. Ces événements sont synchronisés avec la préparation de l'utérus à l'implantation, afin que l'implantation ait précisément lieu durant la fenêtre de réceptivité. Nous démontrons :

- que les changements associés à la préparation de l'embryon à l'implantation sont l'augmentation de la taille du blastocyste, la prolifération cellulaire, ainsi que l'augmentation de la synthèse de protéines et d'ADN;
- l'implication des facteurs FGF4 et FGFR2 dans la reprise du développement de l'embryon suite à la sortie de la diapause;
- l'implication de la progranuline dans la prolifération des cellules du trophoblaste et de l'épithélium de l'endomètre, ainsi qu'au cours de l'angiogénèse durant les différentes étapes de l'implantation;
- l'implication de PPAR γ dans la différenciation du trophoblaste avant et après l'implantation, et durant les premiers stades du développement du placenta;

- l'implication de l'ostéopontine et de l'adipophiline dans la réponse aux prostaglandines lors de l'implantation et des premiers stades de développement du placenta.

L'implantation embryonnaire est une réaction impliquant une très grande variété de facteurs qui pour la plupart demeurent inconnus, et ces facteurs interagissent ensemble de manière très complexe, mais toujours de façon hautement coordonnée. L'implantation a pour particularité d'être un phénomène biologique qui implique deux individus génétiquement différents. Une meilleure compréhension de ce système biologique propre aux mammifères, mais ayant évolué de façon extrêmement variée selon les espèces, nous permettrait de mieux comprendre certaines causes d'infertilité. Cela nous permettrait également d'élargir les connaissances actuelles sur la biologie moléculaire et cellulaire impliquée dans d'autres phénomènes tels que le cancer, étant donné les similarités frappantes entre l'évolution d'un cancer, une invasion non contrôlée, et le développement du placenta dans l'utérus, une invasion par le trophoblaste qui dans ce cas, se fait de manière précise et contrôlée.

6.1 La chronologie des changements intervenants dans l'embryon en préparation à l'implantation

Le vison est un animal à diapause embryonnaire obligatoire. Suite à sa sortie de la diapause, l'embryon subit des changements afin d'être apte à l'implantation. L'implantation et la reprise du développement embryonnaire peuvent être induites de façon dirigée expérimentalement par l'administration de prolactine exogène, ceci dans un but de synchroniser les femelles gestantes de différents groupes expérimentaux. Il est ainsi

possible d'étudier les événements et l'expression des gènes qui sont induits lors de la reprise du développement, en vue de l'implantation. La nature des événements suivant la reprise du développement embryonnaire après la sortie de la diapause n'est cependant pas encore bien comprise. Nous avons donc entrepris dans un premier temps, de caractériser les changements de taille, de synthèse d'ADN et de protéines, et la prolifération cellulaire de l'embryon suite à sa sortie de diapause.

Bien que nous démontrions une augmentation de taille ainsi qu'une reprise évidente de la synthèse d'ADN et de protéines dans l'embryon de vison lors de sa sortie de sa diapause, les données que nous avons accumulées ne nous permettent pas d'établir de façon précise l'ordre chronologique selon lequel ces événements sont repris. Une expérience d'incorporation de [3H]-thymidine dans les molécules d'ADN nouvellement synthétisées nous aurait donné accès à des informations plus quantitatives quant au moment de la reprise de la synthèse d'ADN, en utilisant des embryons prélevés dès le premier jour suivant l'administration de la prolactine qui induit la sortie de la diapause. Malheureusement, les expériences que l'on peut faire *in situ* sur des embryons de visons sont non seulement limitées par la disponibilité des échantillons, mais aussi par la fragilité des embryons. Il faut tout d'abord enlever la zone pellucide très épaisse et imperméable avant d'effectuer des manipulations sur les embryons de vison, ce qui les rendent très vulnérables aux multiples manipulations qu'on doit effectuer pour les expériences *in situ*.

Nous avons par ailleurs détecté un premier changement (non significatif) dans la taille du blastocyste dès le premier jour de traitement à la prolactine, avant les premiers changements de synthèse d'ADN ou de protéines. Ceci suggère qu'on ne peut pas rejeter

l'hypothèse que la première expansion du diamètre soit causée par une entrée de fluides à l'intérieur du blastocoele, comme le proposent les travaux de Daniel (Daniel, 1970). Cependant, nous excluons que l'incorporation de fluides soit la seule cause de l'augmentation du diamètre du blastocyste, étant donné que le nombre de cellules du blastocyste augmente de façon importante au cours de la période suivant la reprise du développement, mais précédant l'implantation (données non publiées). Cette augmentation du nombre de cellules du blastocyste couplée à une augmentation de l'incorporation de BrDU par les embryons après la sortie de la diapause appuie l'hypothèse que la division et la prolifération cellulaire sont également des facteurs impliqués dans l'augmentation de la taille de l'embryon avant l'implantation. D'un autre côté, la synthèse de protéines qui débute dès le jour 3 suivant la sortie de la diapause peut non seulement être impliquée dans la prolifération cellulaire, mais peut également être impliquée dans l'incorporation de fluides par le blastocyste. Chez les espèces murines et bovines, des protéines telles que la Na⁺/K⁺-ATPase et les aquaporines (AQP) jouent un rôle dans le maintien de l'osmolarité ainsi que dans l'incorporation de fluides à travers l'épithélium trophoblastique (Watson *et al.*, 2004).

Ces événements qui surviennent dans le blastocyste de vison en préparation à l'implantation ne se comparent pas cependant aux événements qui ont lieu chez les autres espèces. Par exemple, chez la souris, l'expansion du blastocyste et la prolifération cellulaire extensives, telles qu'observées chez le vison, ne semblent pas être nécessaires pour l'éclosion et l'implantation. En premier lieu, le blastocyste de souris possède au total moins de 150 cellules lors de l'implantation (Handyside and Hunter, 1984), tandis que l'on

retrouve plus de 1000 cellules dans le blastocyste près du moment de l'implantation chez le vison (données non-présentées). Par ailleurs, la capsule glycoprotéique persiste lors de l'implantation de l'embryon de vison (Enders, 1957), mais disparaît avant l'implantation de l'embryon murin (Dey *et al.*, 2004). Ceci suggère que les propriétés de prolifération et d'adhésion des cellules du blastocyste lors de l'implantation ne sont pas les mêmes chez les deux espèces. Les articles 2 et 3 étudient plus en profondeur quelques mécanismes impliqués dans ces phénomènes.

6.2 L'établissement de lignées embryonnaires in vitro chez le vison

Les lignées dérivées d'ICM d'embryons de vison que nous avons obtenues démontraient une morphologie plutôt épithéliale, comme rapporté précédemment par Sukoyan *et al.* (Sukoyan *et al.*, 1993). L'expression du transcrit de *FGF4* et l'absence d'expression de *FGFR2* dans les lignées que nous avons obtenues suggèrent que les cellules proviennent bien de l'ICM et non du trophoblaste. Dans le cadre de notre étude cependant, aucune analyse sur la préservation des propriétés pluripotentes de nos cellules n'a été poursuivie, ne nous permettant pas de qualifier celles-ci de cellules souches embryonnaires à proprement parler. La dérivation de lignées issues de l'ICM de visons a été démontrée précédemment par Sukoyan *et al.* (Sukoyan *et al.*, 1993). Ces lignées pouvaient conduire à la formation de tératomes chez des souris athymiques dans lesquelles les cellules étaient injectées. Cependant, lorsque les cellules dérivées de l'ICM étaient injectées dans les blastocystes normaux, aucun animal chimérique n'a été obtenu. Le caractère pluripotent de ces cellules n'a donc pas été démontré. Seule une démonstration de la contribution in vivo de ces cellules au trois tissus germinaux, et de façon plus

importante aux cellules germinales, lors de l'injection de ces cellules dans un blastocyste, nous permettrait de qualifier les cellules dérivées de l'ICM de cellules souches embryonnaires, et ceci n'a bien sûr pas été démontré encore chez le vison. Il reste cependant que la dérivation d'une lignée de cellules souches embryonnaires de visons serait chose utile pour l'étude des facteurs qui influencent l'entrée en diapause des embryons de visons et la reprise du développement embryonnaire par la suite. Nous avons plutôt dirigé la suite de nos travaux vers l'utilisation des lignées trophoblastiques, car le trophoblaste semble être le premier tissu embryonnaire à faire contact avec la paroi utérine lors de l'implantation.

Dans le premier article, nous cherchions à établir lequel des compartiments du blastocyste, soit l'ICM ou le trophoblaste, est le premier à répondre aux signaux de l'utérus suite à la sortie de la diapause. Nous avons donc entrepris d'examiner le potentiel de prolifération in vitro de chacun de ces types cellulaires afin de répondre à cette question. Malheureusement, la culture in vitro ne reflète pas fidèlement les événements qui se passent in vivo, c'est pourquoi les résultats que nous avons obtenus au tableau 3.1 ne nous permettent pas de répondre sans aucun doute à la question précédente. Il est aussi à noter que la corrélation est faible entre nos données d'incorporation de BrDU dans les embryons de vison à différents stades et nos données de la capacité de prolifération de l'ICM et du trophoblaste in vitro. Ceci peut aussi être expliqué par le fait que certains facteurs qui se retrouvent dans le milieu de culture in vitro diffèrent des facteurs retrouvés dans la situation in vivo. Il est plus probable que le profil d'expression de BrDU soit plus près de la réalité étant donné que les conditions dans lesquelles sont faites les expériences se rapprochent

plus des conditions *in vivo*; le BrDU est incorporé dans l'ADN de l'embryon dès les premiers instants de la mise en culture. Nous avons inclus le LIF ou le FGF4 dans les cultures *in vitro* pour encourager la prolifération de l'ICM et du trophoblaste respectivement, et il est possible que ces facteurs aient favorisé ou empêché la prolifération des cellules de façon non naturelle. La coloration différentielle du blastocyste (ICM et trophoblaste) aurait probablement été une meilleure façon de déterminer la séquence des événements de prolifération. Bien que cette coloration ait été bien réussie chez le furet (Kidder *et al.*, 1999), elle n'est pas nécessairement facile à effectuer avec les embryons de visons. Néanmoins, l'établissement de lignées trophoblastiques de vison *in vitro* tel que réalisé au cours de notre étude nous a fourni un outil qui s'est avéré très utile pour l'étude des mécanismes moléculaires qui régulent la prolifération et la différenciation du trophoblaste.

6.3 Le rôle de la progranuline dans l'implantation chez le vison

Tout d'abord, alors que nos données ajoutent une pièce au casse-tête en révélant une forte expression de la progranuline au niveau des cellules trophoblastiques en attachement et des cellules épithéliales utérines au moment de l'implantation chez le vison, il n'est pas encore connu si la progranuline embryonnaire est indispensable pour que la réaction d'implantation ait lieu. Il serait probablement possible à l'aide d'un modèle de souris dont le gène progranuline serait inactivé de faire lumière sur cette question. D'autre part, il serait possible en administrant un anticorps contre le peptide de la progranuline dans l'utérus gestant de la mère de vérifier l'influence de l'inactivation de la progranuline sur le succès de l'implantation, chez la souris ou chez le vison. Étant donné que la découverte de

la progranuline et de son activité biologique est relativement récente, aucun récepteur spécifique à cette molécule n'a été identifié jusqu'à présent. On spécule par contre que la progranuline (Xia and Serrero, 1998) ainsi que les peptides granuline/ épithéline (Culouscou *et al.*, 1993) produits du clivage de la progranuline sont capables de lier de façon spécifique des récepteurs membranaires. Si ces récepteurs activés par la progranuline étaient connus, il serait intéressant de les bloquer de façon spécifique ou de les inactiver à l'aide d'un modèle de souris modifiée génétiquement, pour vérifier l'impact de l'activité de la progranuline sur l'implantation. Somme toute, nos données d'expression de la progranuline chez le vison et le fait que l'inactivation de la progranuline par un antisérum empêche l'éclosion du blastocyste de souris *in vitro* (Qin *et al.*, 2005) soutiennent la notion que la progranuline est importante pour l'implantation. Cependant, un rôle essentiel pour la progranuline dans l'implantation n'a toujours pas été démontré chez aucune espèce dans un contexte *in vivo*.

Dans un deuxième temps, le groupe de (Diaz-Cueto *et al.*, 2000) ont examiné précédemment le patron d'expression de la progranuline dans l'embryon de souris avant le moment de l'implantation. Toutefois, il n'est pas encore clair si l'embryon en diapause exprime déjà la progranuline, ou si l'expression de la progranuline est induite seulement lorsque l'embryon reprend son développement suite à sa sortie de la diapause. De plus, nous ne savons pas à ce jour si la progranuline, sécrétée par l'épithélium luminal de l'utérus de la mère, influence le développement de l'embryon avant l'implantation, et si les embryons possèdent des récepteurs à la progranuline. Les données que nous avons présentées chez le vison, couplées aux données actuelles qui existent chez la souris (Diaz-

Cueto *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2005), suggèrent que la progranuline induit la prolifération du trophoblaste. Ces évidences nous permettent donc de croire que la progranuline est impliquée d'une certaine façon dans la reprise du développement du blastocyste après la sortie de la diapause.

Dans un troisième temps, nous avons démontré un patron d'expression qui suggère que la progranuline exerce des rôles importants durant l'implantation, la décidualisation et la formation du placenta, mais la régulation de ce gène dans l'utérus et le trophoblaste reste encore indéterminée. Il serait intéressant d'identifier, à l'aide de nos cultures de cellules trophoblastiques *in vitro*, les facteurs aptes à induire l'expression de la progranuline. Il serait d'autant plus intéressant de vérifier si la progranuline stimule la prolifération des cellules trophoblastiques et des cellules épithéliales de l'endomètre, et si elle soutient l'angiogénèse dans le placenta du vison *in vitro* et/ou *in vivo*.

6.4 Le rôle de PPAR γ dans l'implantation

Comme mentionné dans la section « introduction », plusieurs évidences suggèrent que COX-2 et les prostanoïdes dérivées jouent un rôle important dans l'implantation chez les carnivores et les rongeurs. Nous nous sommes donc affairés à identifier des facteurs impliqués dans les voies activées par COX-2 pendant l'implantation chez le vison. Dans le troisième manuscrit, nous démontrons un nouveau rôle pour PPAR γ , un récepteur nucléaire des prostaglandines, lors de l'implantation chez le vison.

Chez les mustélidés, juste avant l'adhésion du blastocyste à la paroi utérine, les cellules trophoblastiques se différencient à certains endroits focalisés sous l'influence de

facteurs de différenciation et forment les plaques syncytiotrophoblastiques. Les mécanismes dirigeant la formation de ces plaques syncytiotrophoblastiques sont actuellement méconnus. L'expression de PPAR γ dans le syncytiotrophoblaste avant l'implantation suggère que ce récepteur nucléaire est impliqué dans la formation des plaques.

Il est maintenant évident que PPAR γ est essentiel au développement du placenta chez la souris, étant donné que l'inactivation du gène *PPAR γ* est léthal au stade embryonnaire à cause de malformations du placenta (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999). Cependant, il n'est pas aussi évident que PPAR γ est important pour l'implantation dans le modèle murin, et aucune évidence n'indique que la formation du syncytiotrophoblaste survient avant l'implantation de l'embryon. Par ailleurs, l'expression de l'ARNm et de la protéine PPAR γ chez la souris ne correspond pas avec le moment de l'implantation (Barak *et al.*, 1999). Pour ces raisons, nous croyons qu'une déficience du gène *PPAR γ* serait plus susceptible d'interférer avec l'implantation chez le vison que chez la souris.

6.5 L'activation de la différenciation des cellules trophoblastiques par la prostaglandine 15-d-PGJ₂, via son récepteur PPAR γ

Étant donné que le rôle de PPAR γ est bien connu dans la différenciation des adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1994; Barak *et al.*, 1999) et des tumeurs du colon (Tontonoz *et al.*, 1997), nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle PPAR γ serait impliqué dans la différenciation des cellules du trophoblaste en employant la culture in vitro des cellules

trophoblastique de vison. Nous avons démontré que la 15-d-PGJ₂ et la troglitazone sont des ligands capables d'activer de façon spécifique PPAR γ dans les cellules trophoblastiques de vison en culture. Nous avons également démontré que PPAR γ est impliqué dans la différenciation terminale des cellules du trophoblaste chez le vison et que la transcription de plusieurs gènes est régulée par ce récepteur nucléaire dans ces cellules. Il n'est cependant pas clair si le ligand naturel de PPAR γ , 15-d-PGJ₂, est capable d'induire la différenciation des cellules du trophoblaste de façon indépendante de PPAR γ . Il serait intéressant d'explorer quelles voies intracellulaires sont activées par 15-d-PGJ₂, et d'examiner si le récepteur membranaire de la prostaglandine D₂, qui peut également être activé par 15-d-PGJ₂, est présent dans le trophoblaste au moment de l'implantation.

À l'aide d'une construction génique comprenant un gène rapporteur de luciférase et un promoteur minimal couplé à trois PPRE, nous avons démontré que les ligands 15-d-PGJ₂ et troglitazone pouvaient stimuler l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Ces résultats révèlent toutefois un faible niveau d'expression du gène rapporteur en présence de 15-d-PGJ₂ (environ 2,5 fois plus que le contrôle). Les niveaux observés sont néanmoins statistiquement différents du contrôle, et chaque transfection a été réalisée au moins trois fois. Les faibles niveaux d'expression observés pourraient être expliqués par le fait que l'efficacité de la transfection transitoire effectuée à l'aide de l'agent lipofectamine est très faible. En outre, nous n'avons pas introduit de gène rapporteur nous permettant de mesurer en pourcentage l'efficacité de transfection. La co-transfection dans nos cellules d'un gène rapporteur tel que la « green fluorescent protein (GFP) » exprimé de façon constitutive aurait permis de mesurer à l'aide du FACS le pourcentage de cellules transfectées. D'autre

part, PPAR γ est très peu exprimé dans les cellules non différenciées et devient plus fortement exprimé qu'après quelques jours en culture en présence de 15-d-PGJ₂, tel que nous l'avons démontré par PCR en temps réel et par immunohistochimie. Par conséquent, il est possible que PPAR γ fût présent qu'en très faible quantité dans nos cellules transfectées après seulement 36h de traitement avec 15-d-PGJ₂. Ceci pourrait également expliquer le faible niveau d'activation transcriptionnelle de PPAR γ en réponse aux ligands que nous avons observé lors de notre expérience de transfection.

Nos résultats proposent que l'expression de PPAR γ est induite dans les cellules cytotrophoblastiques en différenciation, et est graduellement plus élevée dans les cellules syncytiotrophoblastiques matures. Ceci a également été remarqué dans d'autres contextes connus comme celui de la différenciation des adipocytes. Dans ce contexte, PPAR γ agit comme facteur précurseur de la différenciation, et son expression reste élevée dans les cellules différenciées afin de favoriser la transcription de gènes cibles qui vont favoriser l'homéostasie des lipides, comme par exemple, l'«adipocyte protein 2 (aP2)» (Rosen, 2005). Dans les cellules trophoblastiques de vison, nous avons remarqué que l'ARNm de *PPAR γ* augmente après traitement avec 15-d-PGJ₂, et que l'expression de la protéine est induite au même moment. Cependant, nous n'avons pas effectué d'analyses quantitatives de protéines par immunobuvardage, et nous ne savons pas à ce point-ci si les niveaux de protéines de PPAR γ augmentent de la même façon que l'ARNm. Par ailleurs, dans les préadipocytes et les adipocytes matures, les facteurs de transcription CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β et C/EBP δ contribuent à induire et maintenir constante l'expression de PPAR γ , et PPAR γ induit à son tour l'expression de C/EBP α (Rosen, 2005).

Il serait intéressant d'examiner si C/EBP joue un rôle également dans l'augmentation de l'ARNm de *PPAR γ* que nous observons durant la différenciation des cellules trophoblastiques de vison.

6.6 La différenciation du trophoblaste chez le vison, étude d'une espèce comparative

Les études sur les cellules trophoblastiques de visons n'en sont qu'à un stade embryonnaire, on ne connaît pas encore les marqueurs qui caractérisent l'état différencié ou indifférencié du trophoblaste chez cette espèce. Afin de caractériser la lignée trophoblastique de vison, nous avons choisi d'examiner des gènes dont le patron d'expression est connu dans les cellules trophoblastiques de souris. Nous démontrons dans le troisième article que les cellules trophoblastiques de visons expriment des marqueurs que l'on retrouve également chez la souris. Cependant, nous n'avons pu détecter de changement d'expression de ces gènes dans les cellules de vison en présence de la 15-d-PGJ₂ ou de la troglitazone. Par contre, certains gènes comme l'ostéopontine et l'adipophiline, tous deux connus pour être exprimés dans les types différenciés du placenta chez l'humain, sont modulés lors de la différenciation du trophoblaste chez le vison. La sécrétion d'une choriogonadotropine telle que l'hormone choriogonadotropine humaine (hCG) aurait été un autre aspect qui aurait été intéressant à mesurer lors de la différenciation du trophoblaste chez le vison. Chez l'humain, l'hCG est sécrétée par le syncytiotrophoblaste, mais pas par le cytotrophoblaste (Schaiff *et al.*, 2006). Malheureusement, le placenta de vison ne sécrète pas une hormone de ce genre, et par

conséquent, nous ne pouvons utiliser un tel marqueur de différenciation du trophoblaste chez cette espèce.

Le changement de morphologie des cellules trophoblastiques de vison est aussi un critère intéressant pour évaluer l'état de différenciation. Chez le vison comme chez la souris, les cellules trophoblastiques qui semblent indifférenciées possèdent un haut ratio noyau: cytoplasme, prolifèrent rapidement et forment des vésicules trophoblastiques. Une forte adhésion entre les cellules et une faible adhésion au substrat de gélatine caractérisent également ces cellules. Lorsqu'on induit la différenciation de ces cellules à l'aide d'un ligand de PPAR γ , ou lorsque la différenciation est induite de façon spontanée, les cellules possèdent plutôt un faible ratio noyau: cytoplasme, l'adhésion des cellules au substrat du fond du p \acute{e} tri est augmentée, il n'y a plus de formation de vésicules flottantes, et la trypsine ne parvient pas à faire détacher ces cellules facilement du substrat comme c'est le cas avec les cellules indifférenciées. Chez le vison, ces cellules différenciées, attachées solidement au substrat in vitro, expriment d'ailleurs des gènes reconnus pour jouer un rôle d'adhésion cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire, comme les intégrines (données non présentées) et l'ostéopontine. Il serait par ailleurs intéressant d'effectuer des essais sur Matrigel© avec chambres d'invasion pour vérifier plus concrètement les propriétés invasives des cellules trophoblastiques de vison traitées avec les ligands de PPAR γ .

6.7 Directions futures

À l'aide d'un modèle animal d'implantation différée, une approche plus globale pour l'identification des gènes impliqués dans l'implantation serait une voie à suivre, afin

de faire la lumière sur les processus de l'implantation. Par exemple, une technique intéressante est celle de l'hybridation soustractive suppressive (SSH), qui permet de comparer les profils d'expression d'ARNm entre deux populations de cellules ou de tissus. À l'aide de cette technique, nous pourrions cibler les transcrits qui sont induits à plus forte intensité et ensuite analyser leur importance dans le processus de l'implantation. Nous pourrions également comparer le profil d'expression d'ARNm des cellules du trophoblaste avec ou sans l'influence de 15-d-PGJ₂ ce qui nous permettrait d'identifier plusieurs gènes possiblement impliqués dans la différenciation du trophoblaste, étape cruciale à l'implantation. À l'aide de cette même technique, nous pourrions également identifier des gènes induits par la progranuline dans le trophoblaste et dans les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre pour mieux comprendre le rôle de la progranuline dans l'implantation et le développement du placenta.

Somme toute, nous avons ajouté une autre pièce au casse-tête dans la compréhension du rôle essentiel de la voie de COX-2 et des prostaglandines durant l'implantation chez les carnivores, en démontrant le rôle du récepteur nucléaire de 15-d-PGJ₂ dans l'implantation. Nous avons identifié des acteurs clés dans les interactions foeto-maternelles chez le vison, impliqués à la fois dans la prolifération du trophoblaste, le développement du blastocyste suivant la sortie de la diapause, l'attachement du blastocyste, la prolifération et la différenciation des cellules cytotrophoblastiques, l'invasion de l'endomètre, la prolifération et la transformation des cellules de l'endomètre, ainsi que dans l'angiogénèse durant la formation du placenta. Les travaux présentés dans cette thèse révèlent donc une avance significative dans l'élucidation des événements impliqués dans la

sortie de la diapause embryonnaire obligatoire, dans l'implantation et dans le début de la formation du placenta endothéliochorial des espèces carnivores. Toutefois, plusieurs défis devront encore être relevés pour faire progresser nos connaissances dans ce domaine.

7.0 CONCLUSIONS GÉNÉRALES

7.1 La sortie de la diapause embryonnaire

Lors de notre première étude, nous avons tracé le profil des changements qui ont lieu dans l'embryon entre le moment de la sortie de la diapause et le moment de l'implantation. Nous avons démontré que suite à la sortie de la diapause embryonnaire, l'embryon augmente son diamètre de façon logarithmique et peut à nouveau synthétiser de l'ADN et des protéines. D'autre part, la prolifération cellulaire du trophoblaste et du bouton embryonnaire est réinitiée suite à la réactivation du développement de l'embryon. Ces changements sont associés avec la préparation de l'embryon pour l'implantation. Nous avons également démontré que le facteur de croissance FGF4 et son récepteur FGFR2 sont exprimés de façon différentielle dans les embryons activés et en diapause (tableau 7.1), et que ces facteurs sont vraisemblablement impliqués dans la prolifération du trophoblaste avant l'implantation.

7.2 L'expression et le rôle probable de la progranuline en période périimplantatoire

Nous avons démontré lors de cette étude que le patron d'expression de la progranuline (tableau 7.1) coïncide avec plusieurs événements importants qui ont lieu dans l'embryon et l'utérus pour l'implantation et la formation du placenta :

- L'expression de la progranuline dans les cellules du cytotrophoblaste est très élevée lors de leur prolifération et lors de la formation des villosités, ce qui indique que la progranuline joue possiblement un rôle important dans la prolifération dirigée des cellules du cytotrophoblaste.
- L'expression de la progranuline est observée dans les vaisseaux sanguins de la zone médiane, mais non pas dans la zone basale de l'utérus, ce qui suggère que ce facteur de croissance joue un rôle dans l'angiogénèse lors de la formation du placenta. Ceci est appuyé par une forte expression de progranuline dans les cellules endothéliales hypertrophiées durant la formation du labyrinthe, lorsque l'activité angiogénique est très élevée dans l'endomètre.
- La forte expression de la progranuline dans les cellules épithéliales glandulaires (non-transformées) de l'endomètre tout au long de la période périimplantatoire indique que la progranuline est importante pour l'activité de sécrétion de ces glandes.
- Finalement, l'expression de la progranuline dans les cellules épithéliales transformées au cours de l'implantation, et l'atténuation de cette expression par la suite sont des résultats qui indiquent que la progranuline est associée à la réaction épithéliale d'implantation chez le vison.

7.3 L'implantation et la différenciation du trophoblaste sont des événements influencés par l'activité de PPAR γ

Notre étude portant sur la caractérisation et le mécanisme d'action de PPAR γ nous a dirigé vers les conclusions suivantes :

- L'expression de PPAR γ et RXR α est présente au moment de l'implantation du blastocyste dans les cellules du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste, et ceci suggère que ces récepteurs sont impliqués dans l'attachement du blastocyste à la paroi utérine et participent à la formation du placenta.
- Les ligands spécifiques de PPAR γ , 15-d-PGJ₂ et troglitazone, stimulent la transcription d'un gène rapporteur dirigé par les PPRE. L'antagoniste de PPAR γ , GW9662, atténue cependant la stimulation engendrée par les ligands, ce qui indique que les ligands utilisés stimulent de façon spécifique l'activité transcriptionnelle de PPAR γ dans les cellules de trophoblaste en culture.
- Le ligand naturel 15-d-PGJ₂ provoque un changement morphologique des cellules de trophoblaste, stimule la transcription et la traduction de PPAR γ et atténue la prolifération des cellules de trophoblaste.
- Le ligand naturel 15-d-PGJ₂ est capable de promouvoir l'expression de gènes marqueurs associés à la différenciation des cellules de trophoblaste (l'ostéopontine et l'adipophiline). L'augmentation de l'expression des gènes marqueurs est d'autant plus augmentée si le ligand de RXR α est présent, ce qui appuie que l'augmentation d'expression de ces gènes est influencée par l'hétérodimère PPAR γ / RXR α .

Les résultats obtenus suggèrent donc que PPAR γ soit impliqué dans la différenciation des cellules de trophoblaste en cellules du syncytiotrophoblaste. Le patron d'expression de PPAR γ in vivo (tableau 7.1) suggère que ce récepteur nucléaire joue un rôle important dans l'attachement du blastocyste à la paroi utérine, et lors de la formation du labyrinthe du placenta.

Gène	Fonction	Expression
FGF4	Facteur de croissance	<i>Embryonnaire</i> - Transcrit absent en diapause, mais induit dès le jour trois après la réactivation de l'embryon médiée par la prolactine. Exprimé par la masse cellulaire interne du blastocyste.
FGFR2	Récepteur de type tyrosine kinase	<i>Embryonnaire</i> - Transcrit absent en diapause, induit dès le jour cinq après la réactivation de l'embryon médiée par la prolactine. Exprimé par le trophoblaste.
Progranuline	Facteur de croissance	<i>Embryonnaire</i> - Transcrit et protéine fortement exprimés dans les cellules du cytotrophoblaste au moment de l'implantation et au début de la formation du placenta, mais faiblement exprimés dans les cellules du syncytiotrophoblaste. <i>Utérine</i> - Transcrit et protéine exprimés dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'utérus réactivé, dans les glandes endométriales en transformation, dans les glandes basales et dans l'endothélium des vaisseaux sanguins nouvellement formés.
PPAR γ	Récepteur nucléaire	<i>Embryonnaire</i> - Forte expression du transcrit et de la protéine dans les cellules du cytotrophoblaste en différenciation et dans les cellules du syncytiotrophoblaste différenciées. Expression induite par son propre ligand, 15-d-PGJ ₂ .
RXR α	Récepteur nucléaire	<i>Embryonnaire</i> - Expression du transcrit et de la protéine modérée dans les cellules du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste lors de l'implantation et de la formation du placenta. <i>Utérine</i> - Expression du transcrit diffuse à travers l'endomètre lors de l'implantation.
Ostéopontine	Glycoprotéine de la matrice extracellulaire	<i>Embryonnaire</i> - Expression du transcrit induite pendant la différenciation des cellules du cytotrophoblaste en cellules du syncytiotrophoblaste in vitro par le ligand de PPAR γ seul, ou en combinaison avec le ligand de RXR α .
Adipophiline	Protéine du métabolisme des acides gras	<i>Embryonnaire</i> - Expression du transcrit induite pendant la différenciation des cellules du cytotrophoblaste en cellules du syncytiotrophoblaste in vitro par le ligand de PPAR γ seul, ou en combinaison avec le ligand de RXR α .

Tableau 7.1 Expression des gènes impliqués dans l'implantation embryonnaire et dans la formation du placenta chez le vison.

8.0 BIBLIOGRAPHIE

- Allais, C. & Martinet, L. (1978) Relation between daylight ratio, plasma progesterone levels and timing of nidation in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* **54**, 133-136.
- Anakwe, O.O. & Gerton, G.L. (1990) Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod* **42**, 317-328.
- Armant, D.R. (2005) Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol* **280**, 260-280.
- Armant, D.R., Wang, J. & Liu, Z. (2000) Intracellular signaling in the developing blastocyst as a consequence of the maternal-embryonic dialogue. *Semin Reprod Med* **18**, 273-287.
- Asami-Miyagishi, R., Iseki, S., Usui, M., Uchida, K., Kubo, H. & Morita, I. (2004) Expression and function of PPARgamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 497-501.
- Baba, T., Hoff, H.B., 3rd, Nemoto, H., Lee, H., Orth, J., Arai, Y. & Gerton, G.L. (1993a) Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. *Mol Reprod Dev* **34**, 233-243.
- Baba, T., Nemoto, H., Watanabe, K., Arai, Y. & Gerton, G.L. (1993b) Exon/intron organization of the gene encoding the mouse epithelin/granulin precursor (acrogranin). *FEBS Lett* **322**, 89-94.
- Backlin, B.M., Gessbo, A., Forsberg, M., Shokrai, A., Rozell, B. & Engstrom, W. (1998a) Expression of the insulin-like growth factor II gene in polychlorinated biphenyl exposed female mink (*Mustela vison*) and their fetuses. *Mol Pathol* **51**, 43-47.

- Backlin, B.M., Persson, E., Jones, C.J. & Dantzer, V.** (1998b) Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure produces placental vascular and trophoblastic lesions in the mink (*Mustela vison*): a light and electron microscopic study. *Apmis* **106**, 785-799.
- Baevsky, U.B.** (1963) The effect of embryonic diapause on the nuclei and mitotic activity of mink and rat blastocysts. In Enders, A.C. (ed) *Delayed Implantation*. University of Chicago Press, pp. 141-153.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A. & Evans, R.M.** (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* **4**, 585-595.
- Bateman, A. & Bennett, H.P.** (1998) Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* **158**, 145-151.
- Bhandari, V. & Bateman, A.** (1992) Structure and chromosomal location of the human granulin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 57-63.
- Bhandari, V., Giaid, A. & Bateman, A.** (1993) The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. *Endocrinology* **133**, 2682-2689.
- Bhandari, V., Palfree, R.G. & Bateman, A.** (1992) Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1715-1719.
- Bhatt, H., Brunet, L.J. & Stewart, C.L.** (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11408-11412.
- Bindon, B.M.** (1969) Mechanism of the inhibition of implantation in suckling mice. *J Endocrinol* **44**, 357-362.
- Bindon, B.M.** (1970) Preimplantation changes after litter removal from suckling mice. *J Endocrinol* **46**, 511-516.
- Bjorkman, N.** (1973) Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. *Acta Anat Suppl (Basel)* **61**, 1-22.

- Bowen, J.A. & Hunt, J.S.** (2000) The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 331-343.
- Cammas, L., Reinaud, P., Bordas, N., Dubois, O., Germain, G. & Charpigny, G.** (2006) Developmental regulation of prostacyclin synthase and prostacyclin receptors in the ovine uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Reproduction* **131**, 917-927.
- Carter, A.M. & Enders, A.C.** (2004) Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 46.
- Chai, N., Patel, Y., Jacobson, K., McMahon, J., McMahon, A. & Rappolee, D.A.** (1998) FGF is an essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* **198**, 105-115.
- Chakraborty, I., Das, S.K., Wang, J. & Dey, S.K.** (1996) Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* **16**, 107-122.
- Chang, M.C.** (1968) Reciprocal insemination and egg transfer between ferrets and mink. *J Exp Zool* **168**, 49-60.
- Chen, J.R., Cheng, J.G., Shatzer, T., Sewell, L., Hernandez, L. & Stewart, C.L.** (2000) Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* **141**, 4365-4372.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Fruchart, J.C. & Staels, B.** (2005) Pleiotropic effects of fibrates. *Curr Atheroscler Rep* **7**, 396-401.
- Concannon, P.W., Spraker, T.R., Casey, H.W. & Hansel, W.** (1981) Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult beagle bitches. *Fertil Steril* **36**, 373-387.
- Cronier, L., Bastide, B., Herve, J.C., Deleze, J. & Malassine, A.** (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* **135**, 402-408.

- Culouscou, J.M., Carlton, G.W. & Shoyab, M.** (1993) Biochemical analysis of the epithelin receptor. *J Biol Chem* **268**, 10458-10462.
- Curlewis, J.D.** (1992) Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev* **4**, 1-23.
- Curtis Hewitt, S., Goulding, E.H., Eddy, E.M. & Korach, K.S.** (2002) Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* **67**, 1268-1277.
- Daiter, E., Omigbodun, A., Wang, S., Walinsky, D., Strauss, J.F., 3rd, Hoyer, J.R. & Coutifaris, C.** (1996) Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology* **137**, 1785-1790.
- Damsky, C., Sutherland, A. & Fisher, S.** (1993) Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *Faseb J* **7**, 1320-1329.
- Damsky, C.H., Librach, C., Lim, K.H., Fitzgerald, M.L., McMaster, M.T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S.K. & Fisher, S.J.** (1994) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* **120**, 3657-3666.
- Daniel, J.C., Jr.** (1970) Coincidence of embryonic growth and uterine protein in the ferret. *J Embryol Exp Morphol* **24**, 305-312.
- Daniel, R., Daniels, E., He, Z. & Bateman, A.** (2003) Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev Dyn* **227**, 593-599.
- Daniel, R., He, Z., Carmichael, K.P., Halper, J. & Bateman, A.** (2000) Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* **48**, 999-1009.
- Daoud, G., Simoneau, L., Masse, A., Rassart, E. & Lafond, J.** (2005) Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1687**, 181-194.

- Das, N., Wang, J. & Dey, S.K.** (1997) Uterine preparation for implantation in the mouse is associated with coordinate expression of estrogen-responsive finger protein and estrogen receptor. *Mol Reprod Dev* **46**, 499-506.
- Das, S.K., Chakraborty, I., Paria, B.C., Wang, X.N., Plowman, G. & Dey, S.K.** (1995) Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* **9**, 691-705.
- Das, S.K., Wang, J., Dey, S.K. & Mead, R.A.** (1999) Spatiotemporal expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 during delayed implantation and the periimplantation period in the Western spotted skunk. *Biol Reprod* **60**, 893-899.
- Das, S.K., Wang, X.N., Paria, B.C., Damm, D., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., Andrews, G.K. & Dey, S.K.** (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* **120**, 1071-1083.
- Denda, S., Reichardt, L.F. & Muller, U.** (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha 8 \beta 1$ and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**, 1425-1435.
- Denhardt, D.T. & Guo, X.** (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J* **7**, 1475-1482.
- Dennis, E.A.** (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* **269**, 13057-13060.
- Desvergne, B. & Wahli, W.** (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-688.
- Dey, S.K.** (1996) Implantation. In Adashi, E., Rock, J.A., Rosenwaks, Z. (ed) *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Lippincott-Raven, pp. 421-434.
- Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T. & Wang, H.** (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* **25**, 341-373.
- Diaz-Cueto, L., Stein, P., Jacobs, A., Schultz, R.M. & Gerton, G.L.** (2000) Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol* **217**, 406-418.

- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M. & et al.** (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**, 406-409.
- Donald, C.D., Laddu, A., Chandham, P., Lim, S.D., Cohen, C., Amin, M., Gerton, G.L., Marshall, F.F. & Petros, J.A.** (2001) Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. *Anticancer Res* **21**, 3739-3742.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. & Wahli, W.** (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68**, 879-887.
- Duby, R.T. & Travis, H.F.** (1972) Photoperiodic control of fur growth and reproduction in the mink (*Mustela vison*). *J Exp Zool* **182**, 217-226.
- Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D.E. & Berger, J.** (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 431-437.
- Enders, A.C.** (1957) Histological observations on the chorio-allantoic placenta of the mink. *Anat Rec* **127**, 231-245.
- Enders, A.C. & Mead, R.A.** (1996) Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the western spotted skunk. *Anat Rec* **244**, 297-315.
- Enders, A.C. & Schlafke, S.** (1969) Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat* **125**, 1-29.
- Enders, A.C. & Schlafke, S.** (1972) Implantation in the ferret: epithelial penetration. *Am J Anat* **133**, 291-315.
- Enders, R.K.** (1952) Reproduction in the mink (*Mustela vison*). *Proc. Am. Phil. Soc.* **96**, 691-755.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J.** (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 139-149.

- Evans, R.M.** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H. & Auwerx, J.** (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* **272**, 18779-18789.
- Fassler, R. & Meyer, M.** (1995) Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**, 1896-1908.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M. & Goldfarb, M.** (1995) Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, 246-249.
- Ferrara, N. & Henzel, W.J.** (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 851-858.
- Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N. & Termine, J.D.** (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* **262**, 9702-9708.
- Foresman, K.R. & Mead, R.A.** (1978) Luteal control of nidation in the Ferret (*Mustela putorius*). *Biol Reprod* **18**, 490-496.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. & Evans, R.M.** (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.
- Fournier, T., Tsatsaris, V., Handschuh, K. & Evain-Brion, D.** (2007) PPARs and the placenta. *Placenta* **28**, 65-76.
- Franzen, A. & Heinegard, D.** (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* **232**, 715-724.
- Garcia Mata, R.** (1984) Light and sexual cycles in mink. *Proc III Congr Int sur la Prod des Anim Fourrures* **28**, 1-7.
- Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E.** (1999) Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032.

- Giguere, V.** (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* **20**, 689-725.
- Givol, D., Eswarakumar, V.P. & Lonai, P.** (2003) Molecular and cellular biology of FGF signaling. In Epstein, C.J., Erickson, R.P. & Wynshaw-Boris, A. (eds) *Inborn errors of development- the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis*. Oxford University Press, pp. 367-379.
- Givol, D. & Yayon, A.** (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *Faseb J* **6**, 3362-3369.
- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A. & Schilling, J.** (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7311-7315.
- Green, S. & Chambon, P.** (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* **4**, 309-314.
- Gulamhusein, A.P. & Beck, F.** (1973) Light and electron microscope observations at the pre- and early post-implantation stages in the ferret uterus. *J Anat* **115**, 159-174.
- Gulamhusein, A.P. & Beck, F.** (1975) Development and structure of the extra-embryonic membranes of the ferret. A light microscopic and ultrastructural study. *J Anat* **120**, 349-365.
- Gulyas, B.J. & Daniel, J.C., Jr.** (1967) Oxygen consumption in diapausing blastocysts. *J Cell Physiol* **70**, 33-36.
- Gulyas, B.J. & Daniel, J.C., Jr.** (1969) Incorporation of labeled nucleic acid and protein precursors by diapausing and nondiapausing blastocysts. *Biol Reprod* **1**, 11-20.
- Gulyas, B.J., Daniel, J.C., Jr. & Krishnan, R.S.** (1969) Incorporation of labelled nucleosides in vitro by rabbit and mink blastocysts in the presence of blastokinin or serum. *J Reprod Fertil* **20**, 255-262.
- Gupta, A., Huet, Y.M. & Dey, S.K.** (1989) Evidence for prostaglandins and leukotrienes as mediators of phase I of estrogen action in implantation in the mouse. *Endocrinology* **124**, 546-548.
- Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S. & Dey, S.K.** (2004) Global gene expression analysis identifies molecular pathways

distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10326-10331.

Hamilton, W.J. (1934) The early stages in the development of the ferret: Fertilization to the formation of the prochordal plate. *Trans Roy Soc Edin* **58**, 251-258.

Hammond, J. (1951) Control by light of reproduction in ferrets and mink. *Nature* **167**, 150-151.

Hammond, J. & Marshall, F.H.A. (1930) Oestrus and pseudopregnancy in the ferret. *Proc Roy Soc Lond series B*, 105-607.

Hammond, J. & Walton, A. (1934) Notes on ovulation and fertilization in the ferret. *Brit J Exper biol* **2**, 307.

Handyside, A.H. & Hunter, S. (1984) A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool* **231**, 429-434.

Hansson, A. (1947) The physiology of reproduction in the mink (*Mustela vison* Schreb.) with special reference to delayed implantation. *Acta Zool* **28**, 1-136.

He, Z. & Bateman, A. (1999) Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res* **59**, 3222-3229.

He, Z. & Bateman, A. (2003) Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med* **81**, 600-612.

He, Z., Ismail, A., Kriazhev, L., Sadvakassova, G. & Bateman, A. (2002) Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Res* **62**, 5590-5596.

Hirzel, D.J., Wang, J., Das, S.K., Dey, S.K. & Mead, R.A. (1999) Changes in uterine expression of leukemia inhibitory factor during pregnancy in the Western spotted skunk. *Biol Reprod* **60**, 484-492.

Holcomb, L.C. (1967) Effects of progesterone treatments on delayed implantation in mink. *Ohio J Sci* **67**, 24-31.

Hollingsworth, M.A. & Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**, 45-60.

- X
- Hou, Q., Paria, B.C., Mui, C., Dey, S.K. & Gorski, J.** (1996) Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2376-2381.
- Hrabal, R., Chen, Z., James, S., Bennett, H.P. & Ni, F.** (1996) The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nat Struct Biol* **3**, 747-752.
- Hu, D.D., Lin, E.C., Kovach, N.L., Hoyer, J.R. & Smith, J.W.** (1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *J Biol Chem* **270**, 26232-26238.
- Huang, J.L., Powell, M. & Mead, R.A.** (1993) Luteal protein secretion during preimplantation in the ferret. *Biol Reprod* **48**, 647-654.
- Hunter, T.** (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Hynes, R.O.** (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Illera, M.J., Cullinan, E., Gui, Y., Yuan, L., Beyler, S.A. & Lessey, B.A.** (2000) Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod* **62**, 1285-1290.
- Irvine, R.F.** (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J* **204**, 3-16.
- Issemann, I. & Green, S.** (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650.
- Jaye, M., Schlessinger, J. & Dionne, C.A.** (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1135**, 185-199.
- Johnson, D.C. & Chatterjee, S.** (1993) Epidermal growth factor (EGF) replaces estradiol for the initiation of embryo implantation in the hypophysectomized rat. *Placenta* **14**, 429-438.
- Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W. & Spencer, T.E.** (2003) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* **69**, 1458-1471.

- Jones, C.J., Dantzer, V., Leiser, R., Krebs, C. & Stoddart, R.W.** (1997) Localisation of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial, and haemomonochorial placentation. *Microsc Res Tech* **38**, 100-114.
- Jones, M.B., Michener, C.M., Blanchette, J.O., Kuznetsov, V.A., Raffeld, M., Serrero, G., Emmert-Buck, M.R., Petricoin, E.F., Krizman, D.B., Liotta, L.A. & Kohn, E.C.** (2003) The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 44-51.
- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. & Connolly, D.T.** (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.
- Kennedy, T.G.** (1983) Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci* **36**, 531-543.
- Kidder, J.D., Giles, J.R., Foote, R.H., Richmond, M.E. & Salerno, M.** (1999) Allocation of inner cell mass and trophectoderm cells to the preimplantation blastocyst of the domestic ferret, *Mustela putorius furo*. *J Exp Zool* **283**, 202-209.
- Kimber, S.J.** (2000) Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. *Semin Reprod Med* **18**, 237-253.
- Kimber, S.J. & Spanswick, C.** (2000) Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 77-92.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. & Evans, R.M.** (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771-774.
- Krebs, C., Winther, H., Dantzer, V. & Leiser, R.** (1997) Vascular interrelationships of near-term mink placenta: light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts. *Microsc Res Tech* **38**, 125-136.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Kadowaki, T. &**

- et al.** (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* **4**, 597-609.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stehelin, D.** (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* **11**, 1003-1013.
- Lee, P.L., Johnson, D.E., Cousens, L.S., Fried, V.A. & Williams, L.T.** (1989) Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* **245**, 57-60.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. & Kliewer, S.A.** (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270**, 12953-12956.
- Leiser, R. & Koob, B.** (1993) Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. *J Exp Zool* **266**, 642-656.
- Lessey, B.A.** (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* **61**, 812-814.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. & Ferrara, N.** (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
- Liau, L.M., Lallone, R.L., Seitz, R.S., Buznikov, A., Gregg, J.P., Kornblum, H.I., Nelson, S.F. & Bronstein, J.M.** (2000) Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res* **60**, 1353-1360.
- Lim, H. & Dey, S.K.** (2002) A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* **143**, 3207-3210.
- Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W.G., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K.** (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13**, 1561-1574.

- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K.** (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**, 197-208.
- Lin, X., Buff, E.M., Perrimon, N. & Michelson, A.M.** (1999) Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* **126**, 3715-3723.
- Lopes, F.L., Desmarais, J., Gevry, N.Y., Ledoux, S. & Murphy, B.D.** (2003) Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* **68**, 1926-1933.
- Lopes, F.L., Desmarais, J., Ledoux, S., Gevry, N.Y., Lefevre, P. & Murphy, B.D.** (2006) Transcriptional regulation of uterine vascular endothelial growth factor during early gestation in a carnivore model, *Mustela vison*. *J Biol Chem* **281**, 24602-24611.
- Lopes, F.L., Desmarais, J.A. & Murphy, B.D.** (2004) Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* **128**, 669-678.
- Lopes, F.L., Desmarais, J.A. & Murphy, B.D.** (2007) A comparative view of prostaglandin action in the uterus. In Aplin, J., Fazleabas, A., Glasser, S. & Guidice, L. (eds) *The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives, 2nd Edition*. Informa Healthcare, p. 704 pages
- Lord, E., Murphy, B.D., Desmarais, J.A., Ledoux, S., Beaudry, D. & Palin, M.F.** (2006) Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma transcripts in swine endometrial tissue during early gestation. *Reproduction* **131**, 929-942.
- Lu, R. & Serrero, G.** (2000) Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3993-3998.
- Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B. & Auwerx, J.** (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA

- synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* **272**, 28210-28217.
- Martinet, L. & Allain, D.** (1985) Role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproductive and non-reproductive functions in mink (*Mustela vison*). *Ciba Found Symp* **117**, 170-187.
- Martinet, L., Allais, C. & Allain, D.** (1981) The role of prolactin and LH in luteal function and blastocyst growth in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil Suppl* **29**, 119-130.
- Matsumoto, H., Ma, W.G., Daikoku, T., Zhao, X., Paria, B.C., Das, S.K., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K.** (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* **277**, 29260-29267.
- Matsuo, H. & Strauss, J.F., 3rd** (1994) Peroxisome proliferators and retinoids affect JEG-3 choriocarcinoma cell function. *Endocrinology* **135**, 1135-1145.
- Mead, R.A.** (1971) Effects of light and blinding upon delayed implantation in the spotted skunk. *Biol Reprod* **5**, 214-220.
- Mead, R.A.** (1989) *The physiology and evolution of delayed implantation in carnivores*. Cornell University Press, Ithaca.
- Mead, R.A.** (1993) Embryonic diapause in vertebrates. *J Exp Zool* **266**, 629-641.
- Miglino, M.A., Ambrosio, C.E., dos Santos Martins, D., Wenceslau, C.V., Pfarrer, C. & Leiser, R.** (2006) The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology* **66**, 1699-1702.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M. & Aaronson, S.A.** (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 246-250.
- Moller, O.M.** (1973) The progesterone concentrations in the peripheral plasma of the mink (*Mustela vison*) during pregnancy. *J Endocrinol* **56**, 121-132.
- Moreau, G.M., Arslan, A., Douglas, D.A., Song, J., Smith, L.C. & Murphy, B.D.** (1995) Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines

- from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival in vitro of mink blastocysts in obligate diapause. *Biol Reprod* **53**, 511-518.
- Mossman, H.W.** (1937) Comparative morphogenesis of the fetal membrane and accessory uterine structures. *Cont Embryol*. Carnegie Institute, pp. 129-246.
- Murphy, B.D.** (1979) The role of prolactin in implantation and luteal maintenance in the ferret. *Biol Reprod* **21**, 517-521.
- Murphy, B.D.** (1983) Precocious induction of luteal activation and termination of delayed implantation in mink with the dopamine antagonist pimozide. *Biol Reprod* **29**, 658-662.
- Murphy, B.D.** (1988) Reproductive physiology of female mustelids *Reproductive biology of black-footed ferret*. University Press, pp. 107-123.
- Murphy, B.D., Concannon, P.W. & Travis, H.F.** (1982) Effects of medroxyprogesterone acetate on gestation in mink. *J Reprod Fertil* **66**, 491-497.
- Murphy, B.D., Concannon, P.W., Travis, H.F. & Hansel, W.** (1981) Prolactin: the hypophyseal factor that terminates embryonic diapause in mink. *Biol Reprod* **25**, 487-491.
- Murphy, B.D., DiGregorio, G.B., Douglas, D.A. & Gonzalez-Reyna, A.** (1990) Interactions between melatonin and prolactin during gestation in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* **89**, 423-429.
- Murphy, B.D. & Douglas, D.A.** (1992) *Reproduction in female mink*.
- Murphy, B.D. & James, D.A.** (1974) The effects of light and sympathetic innervation to the head on nidation in mink. *J Exp Zool* **187**, 267-276.
- Murphy, B.D., Mead, R.A. & McKibbin, P.E.** (1983) Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink. *Biol Reprod* **28**, 497-503.
- Murphy, B.D. & Moger, W.H.** (1977) Progestins of mink gestation: the effects of hypophysectomy. *Endocr Res Commun* **4**, 45-60.
- Murphy, B.D. & Rajkumar, K.** (1985) Prolactin as a luteotrophin. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 257-264.

- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H. & Evans, R.M.** (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* **93**, 229-240.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F.** (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**, 1193-1226.
- Ni, H., Sun, T., Ding, N.Z., Ma, X.H. & Yang, Z.M.** (2002) Differential expression of microsomal prostaglandin synthase at implantation sites and in decidual cells of mouse uterus. *Biol Reprod* **67**, 351-358.
- Niswander, L. & Martin, G.R.** (1992) Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* **114**, 755-768.
- Nutting, E.F. & Meyer, R.K.** (1963) Implantation delay, nidation, and embryonal survival in rats treated with ovaria hormones. . In Enders, A.C. (ed) *Delayed implantation*. University of Chicago, pp. 233-252.
- Omigbodun, A., Ziolkiewicz, P., Tessler, C., Hoyer, J.R. & Coutifaris, C.** (1997) Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* **138**, 4308-4315.
- Ornitz, D.M. & Itoh, N.** (2001) Fibroblast growth factors *Genome Biol*, p. REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., Yayon, A., Flanagan, J.G., Svahn, C.M., Levi, E. & Leder, P.** (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* **12**, 240-247.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M.T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D. & Lonai, P.** (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol* **158**, 475-486.
- Orr-Urtreger, A., Givol, D., Yayon, A., Yarden, Y. & Lonai, P.** (1991) Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* **113**, 1419-1434.
- Papke, R.L., Concannon, P.W., Travis, H.F. & Hansel, W.** (1980) Control of luteal function and implantation in the mink by prolactin. *J Anim Sci* **50**, 1102-1107.

- Paria, B.C., Das, S.K., Andrews, G.K. & Dey, S.K.** (1993) Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 55-59.
- Paria, B.C., Das, S.K. & Dey, S.K.** (1998a) Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholesterogen-mediated embryonic activation. *Adv Pharmacol* **42**, 840-843.
- Paria, B.C., Das, S.K., Mead, R.A. & Dey, S.K.** (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in the preimplantation uterus and blastocyst of the western spotted skunk. *Biol Reprod* **51**, 205-213.
- Paria, B.C., Lim, H., Wang, X.N., Liehr, J., Das, S.K. & Dey, S.K.** (1998b) Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* **139**, 5235-5246.
- Paria, B.C., Tan, J., Lubahn, D.B., Dey, S.K. & Das, S.K.** (1999) Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Endocrinology* **140**, 2704-2710.
- Pearson, O.P. & Enders, R.K.** (1944) Duration of pregnancy in certain mustelids. *J Exp Zool* **95**, 21-35.
- Pfarrer, C., Winther, H., Leiser, R. & Dantzer, V.** (1999) The development of the endotheliochorial mink placenta: light microscopy and scanning electron microscopical morphometry of maternal vascular casts. *Anat Embryol (Berl)* **199**, 63-74.
- Pfarrer, C.D., Ruziwa, S.D., Winther, H., Callesen, H., Leiser, R., Schams, D. & Dantzer, V.** (2006) Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta* **27**, 889-898.
- Pilbeam, T.E., Concannon, P.W. & Travis, H.F.** (1979) The annual reproductive cycle of mink (*Mustela vison*). *J Anim Sci* **48**, 578-584.

- Plowman, G.D., Green, J.M., Neubauer, M.G., Buckley, S.D., McDonald, V.L., Todaro, G.J. & Shoyab, M.** (1992) The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem* **267**, 13073-13078.
- Polejaeva, I.A., Reed, W.A., Bunch, T.D., Ellis, L.C. & White, K.L.** (1997) Prolactin-induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells. *J Reprod Fertil* **109**, 229-236.
- Prince, C.W., Oosawa, T., Butler, W.T., Tomana, M., Bhowan, A.S., Bhowan, M. & Schrohenloher, R.E.** (1987) Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem* **262**, 2900-2907.
- Psychoyos, A.** (1973) Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam Horm* **31**, 201-256.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. & Spiegelman, B.M.** (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371.
- Qin, J., Diaz-Cueto, L., Schwarze, J.E., Takahashi, Y., Imai, M., Isuzugawa, K., Yamamoto, S., Chang, K.T., Gerton, G.L. & Imakawa, K.** (2005) Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse. *Biol Reprod* **73**, 434-442.
- Qin, J., Takahashi, Y., Imai, M., Yamamoto, S., Takakura, K., Noda, Y. & Imakawa, K.** (2003) Use of DNA array to screen blastocyst genes potentially involved in the process of murine implantation. *J Reprod Dev* **49**, 473-484.
- Rappolee, D.A., Basilico, C., Patel, Y. & Werb, Z.** (1994) Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development* **120**, 2259-2269.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A. & Olwin, B.B.** (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* **252**, 1705-1708.
- Reese, J., Brown, N., Paria, B.C., Morrow, J. & Dey, S.K.** (1999) COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Mol Cell Endocrinol* **150**, 23-31.

- Renfree, M.B. & Shaw, G.** (2000) Diapause. *Annu Rev Physiol* **62**, 353-375.
- Robinson, A.** (1918) The formation, rupture and closure of ovarian follicles in ferrets and ferret-polecat hybrids, and some associated phenomena. *Trans Roy Soc Edinburgh* **2**, 303-362.
- Rogers, P.W., Murphy, C.R. & Gannon, B.J.** (1982) Changes in the spatial organization of the uterine vasculature during implantation in the rat. *J Reprod Fertil* **65**, 211-214.
- Rosen, E.D.** (2005) The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 31-34.
- Rout, U.K., Wang, J., Paria, B.C. & Armant, D.R.** (2004) Alpha5beta1, alphaVbeta3 and the platelet-associated integrin alphaIIbbeta3 coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Dev Biol* **268**, 135-151.
- Sachs, L. & Shelesnyak, M.C.** (1955) The development and suppression of polyploidy in the developing and suppressed deciduoma in the rat. *J Endocrinol* **12**, 146-151.
- Sapin, V., Dolle, P., Hindelang, C., Kastner, P. & Chambon, P.** (1997) Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXRalpha null fetuses. *Dev Biol* **191**, 29-41.
- Schaiff, W.T., Barak, Y. & Sadovsky, Y.** (2006) The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* **249**, 10-15.
- Schaiff, W.T., Bildirici, I., Cheong, M., Chern, P.L., Nelson, D.M. & Sadovsky, Y.** (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 4267-4275.
- Schaiff, W.T., Carlson, M.G., Smith, S.D., Levy, R., Nelson, D.M. & Sadovsky, Y.** (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3874-3881.
- Schild, R.L., Schaiff, W.T., Carlson, M.G., Cronbach, E.J., Nelson, D.M. & Sadovsky, Y.** (2002) The activity of PPAR gamma in primary human trophoblasts is enhanced by oxidized lipids. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1105-1110.

- Schlafke, S. & Enders, A.C.** (1967) Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J Anat* **102**, 13-32.
- Schlessinger, J.** (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schultz, J.F. & Armant, D.R.** (1995) Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor. *J Biol Chem* **270**, 11522-11531.
- Schultz, J.F., Mayernik, L., Rout, U.K. & Armant, D.R.** (1997) Integrin trafficking regulates adhesion to fibronectin during differentiation of mouse peri-implantation blastocysts. *Dev Genet* **21**, 31-43.
- Schulz, L.C. & Bahr, J.M.** (2003) Glucose-6-phosphate isomerase is necessary for embryo implantation in the domestic ferret. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8561-8566.
- Schwartz, M.A., Schaller, M.D. & Ginsberg, M.H.** (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 549-599.
- Shalom-Barak, T., Nicholas, J.M., Wang, Y., Zhang, X., Ong, E.S., Young, T.H., Gendler, S.J., Evans, R.M. & Barak, Y.** (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls Mucl transcription in trophoblasts. *Mol Cell Biol* **24**, 10661-10669.
- Sherwin, J.R., Freeman, T.C., Stephens, R.J., Kimber, S., Smith, A.G., Chambers, I., Smith, S.K. & Sharkey, A.M.** (2004) Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol* **18**, 2185-2195.
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V. & Lin, J.** (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* **132**, 1387-1395.
- Simmons, D.L., Botting, R.M. & Hla, T.** (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**, 387-437.
- Sinha, A.A. & Mossman, H.W.** (1966) Placentation of the sea otter. *Am J Anat* **119**, 521-553.

- Smith, A.G., Nichols, J., Robertson, M. & Rathjen, P.D.** (1992) Differentiation inhibiting activity (DIA/ LIF) and mouse development. *Dev Biol* **151**, 339-351.
- Smith, W.L. & Dewitt, D.L.** (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* **62**, 167-215.
- Song, J.H.** (1998) Implantation in the mink (*Mustela vison*): Morphologic progression of trophoblast invasion and uterine gene expression. PhD University of Montreal.
- Song, J.H., Houde, A. & Murphy, B.D.** (1998a) Cloning of leukemia inhibitory factor (LIF) and its expression in the uterus during embryonic diapause and implantation in the mink (*Mustela vison*). *Mol Reprod Dev* **51**, 13-21.
- Song, J.H., Sirois, J., Houde, A. & Murphy, B.D.** (1998b) Cloning, developmental expression, and immunohistochemistry of cyclooxygenase 2 in the endometrium during embryo implantation and gestation in the mink (*Mustela vison*). *Endocrinology* **139**, 3629-3636.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. & Lax, I.** (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* **79**, 1015-1024.
- Steven, D.H.** (1975) Anatomy of the placental barrier. In Harrison, R.J. & Asscher, A.W. (eds) *Comparative placentation: Essays in structure and function*. Academic Press, pp. 25-57.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. & Abbondanzo, S.J.** (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* **359**, 76-79.
- Stoufflet, I., Mondain-Monval, M., Simon, P. & Martinet, L.** (1989) Patterns of plasma progesterone, androgen and oestrogen concentrations and in-vitro ovarian steroidogenesis during embryonic diapause and implantation in the mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* **87**, 209-221.
- Strahl, H. & Ballmann, E.** (1915) Embryonalhullen und Plazenta von Putorius furo. *Abhand Kon Akad Wiss* **4**, 1-69.

- Sukoyan, M.A., Vatolin, S.Y., Golubitsa, A.N., Zhelezova, A.I., Semenova, L.A. & Serov, O.L.** (1993) Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* **36**, 148-158.
- Sundqvist, C., Amador, A.G. & Bartke, A.** (1989) Reproduction and fertility in the mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* **85**, 413-441.
- Sundqvist, C., Ellis, L.C. & Bartke, A.** (1988) Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocr Rev* **9**, 247-266.
- Sutherland, A.** (2003) Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Dev Biol* **258**, 241-251.
- Sutherland, A.E., Calarco, P.G. & Damsky, C.H.** (1993) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119**, 1175-1186.
- Suzuki, M. & Nishihara, M.** (2002) Granulin precursor gene: a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genet Metab* **75**, 31-37.
- Takemori, K., Okamura, H., Kanzaki, H., Koshida, M. & Konishi, I.** (1984) Scanning electron microscopy study on corrosion cast of rat uterine vasculature during the first half of pregnancy. *J Anat* **138** (Pt 1), 163-173.
- Tan, J., Paria, B.C., Dey, S.K. & Das, S.K.** (1999) Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* **140**, 5310-5321.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A. & Rossant, J.** (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* **282**, 2072-2075.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Pavan, L., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D. & Fournier, T.** (2001) PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5017-5024.
- Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B.M.** (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156.

- Tontono, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Brun, R.P., Mueller, E., Altiok, S., Oppenheim, H., Evans, R.M. & Spiegelman, B.M.** (1997) Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 237-241.
- Uesaka, T., Yano, K., Yamasaki, M. & Ando, M.** (1995) Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* **99**, 298-306.
- Venge, O.** (1959) Reproduction in the and mink. *Anim. Breed. Abst.* **27**, 129-145.
- Waite, L.L., Person, E.C., Zhou, Y., Lim, K.H., Scanlan, T.S. & Taylor, R.N.** (2000) Placental peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is up-regulated by pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3808-3814.
- Wang, H. & Dey, S.K.** (2005) Lipid signaling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 84-102.
- Wang, J. & Armant, D.R.** (2002) Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs* **172**, 190-201.
- Wang, Q., Fujii, H. & Knipp, G.T.** (2002) Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta* **23**, 661-671.
- Watson, A.J., Natale, D.R. & Barcroft, L.C.** (2004) Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 583-592.
- Weitlauf, H.W.** (1994) Biology of implantation. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press Ltd, pp. 391-440.
- Wendling, O., Chambon, P. & Mark, M.** (1999) Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 547-551.
- Winther, H. & Dantzer, V.** (2001) Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors flt-1 and kdr in the mink placenta. *Placenta* **22**, 457-465.
- Winther, H., Leiser, R., Pfarrer, C. & Dantzer, V.** (1999) Localization of micro- and intermediate filaments in non-pregnant uterus and placenta of the mink suggests

involvement of maternal endothelial cells and periendothelial cells in blood flow regulation. *Anat Embryol (Berl)* **200**, 253-263.

- Xia, X. & Serrero, G.** (1998) Identification of cell surface binding sites for PC-cell-derived growth factor, PCDGF, (epithelin/granulin precursor) on epithelial cells and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 539-543.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. & O'Malley, B.W.** (1998a) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* **279**, 1922-1925.
- Xu, S.Q., Tang, D., Chamberlain, S., Pronk, G., Masiarz, F.R., Kaur, S., Prisco, M., Zanolco-Marani, T. & Baserga, R.** (1998b) The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro. *J Biol Chem* **273**, 20078-20083.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P. & Deng, C.** (1998c) Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-765.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. & Ornitz, D.M.** (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848.
- Yayon, A., Zimmer, Y., Shen, G.H., Avivi, A., Yarden, Y. & Givol, D.** (1992) A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *Embo J* **11**, 1885-1890.
- Yoshinaga, K. & Adams, C.E.** (1966) Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil* **12**, 593-595.
- Young, M.F., Kerr, J.M., Termine, J.D., Wewer, U.M., Wang, M.G., McBride, O.W. & Fisher, L.W.** (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* **7**, 491-502.

- Yuan, C.X., Ito, M., Fondell, J.D., Fu, Z.Y. & Roeder, R.G.** (1998) The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7939-7944.
- Zanocco-Marani, T., Bateman, A., Romano, G., Valentinis, B., He, Z.H. & Baserga, R.** (1999) Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res* **59**, 5331-5340.
- Zhang, Q., Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Wrana, J.L. & Sodek, J.** (1990) Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein. Demonstration that the 23-kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI. *J Biol Chem* **265**, 7583-7589.
- Zhou, J., Gao, G., Crabb, J.W. & Serrero, G.** (1993) Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem* **268**, 10863-10869.
- Zhou, Y., Genbacev, O., Damsky, C.H. & Fisher, S.J.** (1998) Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* **39**, 197-213.
- Zhu, Y., Kan, L., Qi, C., Kanwar, Y.S., Yeldandi, A.V., Rao, M.S. & Reddy, J.K.** (2000) Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol Chem* **275**, 13510-13516.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. & Reddy, J.K.** (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7921-7925.

DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Joëlle Desmarais	Code permanent [REDACTED]
Faculté Faculté de médecine vétérinaire	Département Biomédecine vétérinaire
Programme Doctorat en sciences vétérinaires	Option Reproduction

ARTICLES PROPOSÉS

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.	
Titre The escape of the mink embryo from obligate diapause	
Revue Biology of Reproduction	État Publié

DECLARATION DE L'ÉTUDIANT

Déclaration Participation: Auteure principale, production de la majorité des résultats et écriture de l'article avec l'aide de B.D.Murphy. V. Bordignon a effectué la dérivation des lignées de bouton embryonnaire et de trophoblaste de visons, ainsi que l'analyse de synthèse d'acides nucléiques. F.L.Lopes a aidé à la récolte des échantillons, et le labo B.D.Murphy a produit les résultats de synthèse protéique. Contribution estimée de 75%.	
Signature [REDACTED]	Date 25.04.07

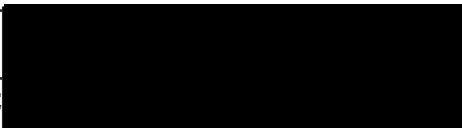
Auteurs Joëlle A. Desmarais, Flavia L. Lopes, Hao Zhang, Sanjoy K. Das, Bruce D. Murphy.	
Titre The Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in trophoblast cell differentiation and embryo implantation	
Revue Biology of Reproduction	État Soumis pour publication

DECLARATION DE L'ÉTUDIANT


Déclaration Participation : Auteure principale, élaboration des idées avec BDM, production de la majorité des résultats, écriture de l'article avec l'aide de B.D.Murphy. F.L.Lopes a aidé à la récolte des échantillons, H. Zhang et S.K.Das ont effectué l'hybridation in situ. Participation totale estimée de 90%.	
Signature [REDACTED]	Date 25.04.07

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Mingju Cao, Andrew Bateman et Bruce D. Murphy.	
Titre Spatio-temporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodelling and angiogenesis.	
Revue Reproduction	État En préparation

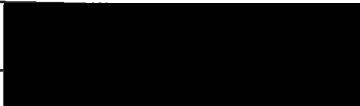
DECLARATION DE L'ETUDIANT

Déclaration Cet article comporte 2 auteurs principaux : Joëlle A. Desmarais et Mingju Cao. Participation : Récolte des échantillons et préparation de ceux-ci pour l'immunohistochimie et l'hybridation in situ, élaboration de l'idée avec Mingju Cao, production d'une partie des résultats (immunohistochimie), interprétation des résultats et écriture du manuscrit avec l'aide e B.D.Murphy. Participation totale estimée de 70%.	
Signature 	Date 25-04-07

AVIS DU DIRE


Déclaration <i>J'approuve l'autorisation de réviser par articles de Mme Desmarais -</i>		
Signature 	Nom BRUCE D MURPHY	Date 25-04-07

DECISION DU DIRECTEUR DE PROGRAMME

Déclaration Je recommande que Madame Joëlle Desmarais puisse rédiger sa thèse sous forme d'articles.		
Signature 	Nom Mario Jacques, vice-doyen	Date 2007 04 25

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

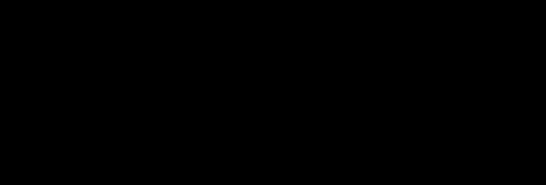
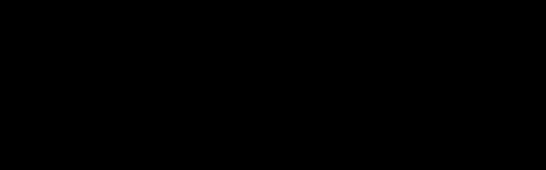
IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Joëlle Desmarais		
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Flavia L. Lopes, Hao Zhang, Sanjoy K. Das, Bruce D. Murphy.	
Titre The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Trophoblast Cell Differentiation and Embryo Implantation	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Sournis

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord que Joëlle Desmarais inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i> <i>As coauthors, we authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscript in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i>	
Coauteur Sanjoy K. Das	 Date 4/09/07
Coauteur Hao Zhang	 Date 4/9/07

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTIC LE'

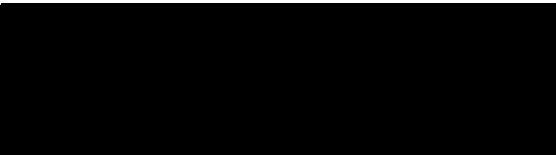
IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l' étudiant Joëlle Desmarais		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.	
Titre The escape of the mink embryo from obligate diapause.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Mars 2004
Auteurs Joëlle A. Desmarais, Flavia L. Lopes, Hao Zhang, Sanjoy K. Das, Bruce D. Murphy.	
Titre The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in trophoblast cell differentiation and embryo implantation.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Soumis
Auteurs Joëlle A. Desmarais, Mingju Cao, Andrew Bateman and Bruce D. Murphy.	
Titre Spatio-temporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodelling and angiogenesis.	
Revue Reproduction	Date de publication En préparation

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteur des articles identifiés ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord à ce que Joëlle Desmarais inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i> <i>As coauthor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscripts in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i>		
Coauteur Bruce D. Murphy	Signature 	Date 21/04/07

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Joëlle Desmarais		Code permanent <div style="background-color: black; width: 150px; height: 20px;"></div>
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.	
Titre The escape of the mink embryo from obligate diapause.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Mars 2004

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord à ce que Joëlle Desmarais inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i> <i>As a coauthor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscript in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i>	
Coauteur Lawrence C. Smith	Date 26/11/17

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ART ICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Joëlle Desmarais		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Reproduction

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.	
Titre The escape of the mink embryo from obligate diapause.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Mars 2004

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord à ce que Joëlle Desmarais inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i> <i>As a coauthor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscript in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i>		
Coauteur Vilceu Bordignon	[REDACTED]	Date 3/04/2007

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Joëlle Desmarais		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.	
Titre The escape of the mink embryo from obligate diapause.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Mars 2004
Auteurs Joëlle A. Desmarais, Flavia L. Lopes, Hao Zhang, Sanjoy K. Das, Bruce D. Murphy.	
Titre The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in trophoblast differentiation and embryo implantation.	
Revue Biology of Reproduction	Date de publication Soumis

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<p><i>À titre de coauteur des articles identifiés ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord que Joëlle Desmarais inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i></p> <p><i>As a coauthor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscripts in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i></p>		
Coauteur Flavia L. Lopes	Signature [REDACTED]	Date 09. April. 07

accord et permission des coauteurs d'un article¹

ification de l'étudiant

Nom de l'étudiant		Code permanent
Joëlle Desmarais		
Sigle du programme	Titre du programme	Option
Ph.D.	Sciences vétérinaires	Reproduction

ription des articles

Auteurs	
Joëlle A. Desmarais, Mingju Cao, Andrew Bateman and Bruce D. Murphy.	
Titre	
Spatio-temporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodelling and angiogenesis.	
Revue	Date de publication
Reproduction	En préparation

aration des coauteurs

Déclaration		
<p><i>A titre de coauteur des articles identifiés ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord à ce que Joëlle Desmarais inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</i></p> <p><i>As coauthor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscripts in her PhD thesis, which is entitled "The foeto-maternal interactions during implantation in the mink".</i></p>		
Coauteur	Signature	Date
Mingju Cao		April 26, 2007
Andrew Bateman		Apr. 26/ 2007

11 du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars

FMV-SAE 2001 06

PERMISSION DE L'ÉDITEUR D'UNE REVUE OU D'UN LIVRE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Joëlle Desmarais		
Ph.D.	Sciences vétérinaires	Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Joëlle A. Desmarais, Vilceu Bordignon, Flavia L. Lopes, Lawrence C. Smith, Bruce D. Murphy.		
The escape of the mink embryo from obligate diapause		
70	662-670	Mars 2004

IDENTIFICATION DE LA REVUE OU DU LIVRE

Biology of Reproduction	
Society for the Study of Reproduction 1619 Monroe Street, Madison, WI 53711-2063, Phone: (608) 256-2777, fax: (608) 256-4610, Email: ssr@ssr.org	25 Avril 2007

DECLARATION DE L'ÉDITEUR

John J. Eppig Mary Ann Handel	
<p>À titre d'éditeur des articles identifiés ci-dessus, j'autorise le microfilmage de la thèse et je suis d'accord à ce que Joëlle Desmarais inclue ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Les interactions foeto-maternelles durant l'implantation chez le vison ».</p> <p>As editor, I authorize the microfilming of this thesis, and agree that Joëlle Desmarais includes the above-mentioned manuscripts in her PhD thesis, which is entitled "The foeto maternal interactions during implantation in the mink".</p>	
John J. Eppig Mary Ann Handel	April 30, 2007



4

